Генетика

УЧЕБНИК ДЛЯ ВУЗОВ

ББК 28.04

Рецензенты: академик РАМН Н.П. Бочков,
доктор медицинских наук, профессор С.И. Козлова

Авторы: Иванов Владимир Ильич; Барышникова Наталья Владимировна;
Билева Джемма Серафимовна; Дадали Елена Леонидовна;
Константинова Людмила Михайловна; Кузнецова Ольга Викторовна;
Поляков Александр Владимирович

Генетика. Учебник для вузов/ Под ред. академика РАМН В.И. Иванова. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – 638 с.: ил.

ISBN 5-94628-146-1

В книгу включены базовые разделы общей генетики, а также обширный молекулярно-генетический материал, полученный при изучении классических генетических объектов и человека. Рассмотрены задачи, методы и перспективы развития медицинской генетики. Приведена классификация и характеристика основных групп наследственных болезней, описаны отдельные нозологические формы. Широко представлены мультифакториальные заболевания, приводятся сведения о прионных болезнях.

Для студентов и аспирантов медико-биологических специальностей.

ISBN 5-94628-146-1

ПРЕДИСЛОВИЕ

Преподавание генетики (как и других биологических наук) на медико-биологических факультетах отражает двойственный характер таких факультетов: за время обучения студенты должны специализироваться сразу в двух областях — медицине и биологии. Поэтому учебные программы по генетике для медико-биологических факультетов по глубине и сложности почти не уступают соответствующим программам биологических факультетов университетов и включают молекулярные и клеточные основы генетики, ее физиологические и онтогенетические аспекты, учение о наследственности и изменчивости в семьях и популяциях, эволюционную и экологическую генетику и т.д. Естественно, не менее углубленным должно быть изучение медицинской генетики — этиологии, патогенеза и клиники наследственных и врожденных заболеваний, роли генетических факторов в развитии других заболеваний, генетических основ диагностики, лечения и профилактики наследственной и иной патологии. Представительно охватить такой широкий круг проблем и вопросов и является основной задачей авторского коллектива данного учебного пособия.

За последние два десятка лет в генетике произошли крупные сдвиги: основное направление исследований сместилось в область изучения молекулярных основ строения и функционирования геномов, установлены полные нуклеотидные последовательности геномов ряда организмов, включая человека, что привело к обособлению самостоятельной дисциплины — геномики и ее важнейших перспективных направлений — функциональной геномики, протеомики и биоинформатики. Все это привело к переосмыслению основных задач медицинской генетики, к интенсивному проникновению генетических подходов и методов в исследования широко распространенных хронических, инфекционных и иных заболеваний.

На этом фоне выход нового учебника генетики для студентов медико-биологических факультетов представляется весьма своевременным. Предлагаемое пособие состоит из двух частей — «Общая генетика» и «Медицинская генетика». Общая часть включает такие темы, как закономерности наследования признаков, установленные Менделем, хромосомная теория наследственности, структура и функции генетического материала и его молекулярная организация, взаимодействие генов, генотип и фенотип, сцепление генов и кроссинговер, генетика пола, молекулярные механизмы репликации, репарации и рекомбинации генетического материала, регуляция генной активности, мутационная изменчивость и мутагенез, нехромосомная наследственность, генетика и онтогенез, популяционная генетика с элементами экологии, и, наконец, геномика и геномные технологии. Материал глав 3 и 4 может показаться избыточно упрощенным и схематичным; такое его изложение обусловлено тем, что

курс генетики читается студентам после курса биохимии, в котором молекулярная организация нуклеиновых кислот рассматривается более обстоятельно.

Специальная часть – «Медицинская генетика» охватывает основную тематику, конкретизирующую общие основы генетики применительно к проблемам медицины. Сюда включены такие темы, как наследственность и патология человека, хромосомные аномалии и синдромы, моногенные болезни, болезни с нетрадиционными типами наследования, генетика широко распространенных заболеваний, профилактика и лечение наследственной патологии.

В основу предлагаемого пособия положен пятнадцатилетний опыт преподавания теоретического и практического курса генетики на кафедре генетики медико-биологического факультета Российского государственного медицинского университета (РГМУ). Соответственно, авторский коллектив включает основной состав преподавателей названной кафедры, представивших материалы своих лекционных и практических занятий со студентами четырех отделений факультета – биофизики, биохимии, медицинской кибернетики и теоретической медицины. Одновременно являясь научными сотрудниками Медико-генетического научного центра РАМН, практически все авторы имеют опыт исследовательской и/или клинической работы в области медицинской генетики.

Если труд авторов будет встречен благосклонно, то в этом они чувствуют себя в значительной мере обязанными своим учителям Н.В. Тимофееву-Ресовскому, О.Я. Керкису, А.А. Малиновскому и Л.О. Бадаляну, чьей светлой памяти с глубокой благодарностью посвящается эта книга.

Как в процессе чтения курса, так и при подготовке рукописи авторы получали большое число ценных советов и замечаний от многих своих коллег. Всем им авторы глубоко благодарны, особенно профессорам О.В. Евграфову, Л.Ф. Курило, кандидатам наук И.Г. Лильп, Л.Ю. Телегину и В.Б. Черных, а также врачу-цитогенетику В.Г. Антоненко.

Академик РАМН
В.И. Иванов

Введение

ПРЕДМЕТ, МЕТОДЫ И ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ СТАНОВЛЕНИЯ ГЕНЕТИКИ

Почти три с половиной миллиона видов животных, растений и микроорганизмов населяют нашу планету. Их численность варьирует в широких пределах: от нескольких десятков особей, как у амурского тигра, до нескольких миллиардов индивидов, как, например, у *Homo sapiens* – человека разумного. Длительность существования на Земле отдельных видов живых организмов исчисляется миллионами лет, простираясь на целые геологические периоды, при этом продолжительность жизни конкретной особи может составлять от нескольких часов (у отдельных видов микроорганизмов) до нескольких тысячелетий (у отдельных видов хвойных деревьев). Длительность существования биологических видов, состоящих из короткоживущих индивидов, обеспечивается процессами размножения, представляющими собой фундаментальное отличие живых систем от мира неживой природы.

Главная особенность размножения живых существ состоит в том, что особи любого вида производят на свет только себе подобных: кошка рождает кошку, а человек – человека. Именно это и называют наследственностью. При этом наследственность не означает тождественность родительских и дочерних особей, а лишь их чрезвычайное сходство между собой и отличие от индивидов, принадлежащих к другим, даже очень близким биологическим видам.

Феномену наследственности неизменно сопутствует феномен изменчивости, отражающий индивидуальные, семейные и иные различия между особями одного вида. В совокупности наследственность и изменчивость живых организмов составляют предмет изучения **генетики**.

Интуитивные представления о наследственности и изменчивости существовали еще в библейские и античные времена, однако обособление генетики как самостоятельной науки стало возможным лишь на рубеже XIX – XX столетий. В это время уже сложились достаточно точные и тонкие методы скрещивания живых организмов и, кроме того, при изучении клеток и хромосом стали использовать микроскопию.

Первые умозрительные гипотезы о механизме наследственности высказывали древнегреческие философы. Согласно **Демокриту** (460 г. до н.э.) все в мире состоит из неделимых частиц – атомов, а «семя есть истечение ... из всего тела и его важнейших частей – костей, мяса и жил». **Гиппократ** (400 г. до н.э.) также считал, что половые продукты состоят из экстрактов, поступающих из всего организма, так что все органы тела непосредственно влияют на признаки потомства (прямое наследование признаков). В одном из произведений Гиппократа(«О священной болезни») получила развитие точка зрения Демокрита, согласно которой «произрастающее семя происходит из всех частей тела; из здоровых – здоровое, а из больных – больное» и поэто-

му «от флегматика рождается флегматик, от желчного – желчный, от чахоточного – чахоточный и от страдающего селезенкой – страдающий селезенкой».

Иначе, но столь же умозрительно рассуждал **Аристотель** (384-322 до н.э.). Критикуя гипотезу своих предшественников о происхождении семени из всех частей тела, он исходил из представлений о наследовании не только морфологических, но и физиологических признаков, а также признаков, свойственных предкам родителей, от которых в семя ничего не отошло. Аристотель считал, что семя образуется в крови, представляет собой продукт переваривания пищи, и «будучи сваренным, отделяется от крови как нечто отличное».

Умозрительные взгляды на наследственность продержались почти до конца XIX века, так **Чарльз Дарвин** в 1868 г. выдвинул «теорию» пангенезиса, согласно которой все клетки животных и растений отделяют от себя крошечные геммулы, рассеянные по всему организму. Геммулы попадают в репродуктивные органы, и таким образом признаки передаются потомкам. Теория строилась на правильном постулате о том, что половые клетки органов размножения содержат особые частицы, передающие признаки от родителей к потомкам. Но второе предположение о попадании этих особых частиц в гонады из всех клеток организма было ошибочным. И через три года незыблемость теории пангенезиса остроумно нарушил кузен Ч. Дарвина – врач **Фрэнсис Гальтон**, который переливал кровь черных кроликов особям с белой окраской, а затем скрещивал белых кроликов между собой. В трех поколениях, полученных в результате таких скрещиваний, не было обнаружено ни малейшего нарушения чистоты серебристо-белой породы.

Научные методы скрещивания растений впервые применил **Иозеф Готлиб Кельрейтер** (1733–1806), работавший в разных городах Европы, в том числе (с 1755 по 1761 г.) в Петербурге. Он разработал метод полукастрации цветков (удаление тычинок с недозревшими пыльниками); применив взаимообратные (реципрокные) направления скрещиваний, установил равноправие пыльцы и семяпочек в передаче наследственных признаков; показал достаточность для завязывания семени минимального количества пыльцы. Кельрейтер скрещивал различные виды табака. При этом в одних скрещиваниях вид *Nicotiana rustica* использовался как материнское растение: *N. rustica* × *N. paniculata*, а в других – как отцовское: *N. paniculata* × *N. rustica*. Сходство гибридов первого поколения, полученных в реципрокных скрещиваниях, затем использовалось генетиками как критерий аутосомного (независимого от пола) типа наследования. Кельрейтер скрещивал также гибриды *N. rustica* × *N. paniculata* с родительским видом *N. paniculata* в течение ряда поколений, добиваясь «возвращения» гибрида к родительскому виду. Кельрейтер открыл также явление гибридной мощности (гетерозиса), которое успешно используется в современной селекции, например, кукурузы.

Методы гибридизации растений Кельрейтера развил дальше английский ботаник **Томас Эндрю Найт** (1759–1838) – организатор и президент (с 1811 г.) Лондонского общества любителей садоводства. Наряду с опытами по гибридизации плодовых растений, он проводил искусственные скрещивания гороха, с тем, чтобы «...удостовериться в действии пыльцы одной разновидности на другую». В своих опытах на горохе (в отличие от Кельрейтера) Найт наблюдал не за общим габитусом растений, а пытался проследить, за отдельными «элементарными» признаками. При этом он

обнаружил, что некоторые признаки при скрещивании «исчезают», а другие сохраняются (доминируют). Так, Найт первым заметил доминирование признака серой кожуры и пурпурной окраски цветков, которое впоследствии доказал Г. Мендель. Кроме того, в его опытах при скрещивании низкорослой разновидности гороха с более крупной доминировала крупная форма. Причину этого явления Найт видел в стимулирующем действии скрещивания.

Работы Кельрейтера и Найта развивали далее и многие другие ботаники. В частности, **К. Ф. Гэртнер** (1772–1850) проделал опыты с 700 видами растений и получил 250 гибридных форм. **Дж. Госс** – член Лондонского общества любителей садоводства экспериментировал с горохом. В его опытах 1820–1821 г.г. у гибридов первого поколения доминировала желтовато-белая окраска горошин (как у отцовской формы). Во втором поколении наблюдалось расщепление: одни бобы имели зеленовато-голубые горошины, другие – желтовато-белые; у большинства зеленовато-голубые и желтовато-белые горошины сочетались в одном бобе. В третьем поколении отсутствовало расщепление среди растений, выросших из зеленовато-голубых горошин и наблюдалось расщепление среди потомков желтовато-белых; причина появления константных форм в потомстве гибридов второго поколения была позднее объяснена Г. Менделем.

Огюстен Сажрэ (1763–1851), практик-садовод, получил известность во Франции, как создатель новых сортов фруктовых деревьев и овощных культур. Впервые в истории гибридизации он стал изучать отдельные признаки растений, подбирая для скрещивания альтернативные пары (мякоть желтая – белая, кожура сетчатая – гладкая и т.д.). Он установил отсутствие смешения изучаемых признаков у дынь: признаки у потомков не исчезали, а только перераспределялись среди них. Признаки, которые не исчезают, а проявляются во втором поколении гибридов, были позже названы Менделем *рецессивными*.

Шарль Нодэн (1815–1899), будучи сотрудником музея естественной истории Ботанического сада в Париже, имел возможность проводить опыты по гибридизации различных видов и разновидностей бахчевых, садовых и декоративных растений. Скрещивая различные виды дурмана, он обнаружил в первом поколении гибридов преобладание признаков одного вида дурмана (*Datura tatula)* над другим (*Datura stramonium)*. Доминирование признаков *Datura tatula* не зависело от того, играли ли растения этого вида роль «отца» или «матери». Однако в большинстве случаев у гибридов первого поколения наблюдался промежуточный тип наследования.

Итак, во второй половине XIX века ученые и практики из многих стран, занимаясь гибридизацией различных видов растений, правильно подметили такие особенности наследования признаков как доминирование, единообразие гибридов первого поколения, расщепление и комбинаторика признаков во втором поколении, одинаковое проявление признаков в реципрокных скрещиваниях.

Грегор Иоганн Мендель (1822–1884), высоко оценивая работы своих предшественников, писал в своих «Опытах над растительными гибридами»: «... до сих пор не удалось установить всеобщего закона образования и развития гибридов ...окончательное решение этого вопроса может быть достигнуто только тогда, когда будут произведены детальные опыты в разных растительных семействах. Среди многочисленных опытов ни один не был произведен в том объеме и таким образом, чтобы можно было оп-

еделить число различных форм, в которых появляются потомки гибридов, с достоерностью распределить эти формы по отдельным поколениям и установить чисснные отношения».

Усовершенствование гибридологического метода, дополнение его математичеким анализом результатов скрещиваний – одна из главных заслуг Г. Менделя. Iменно это помогло ему представить механизм, лежащий в основе закономерноrей наследования признаков у гибридов, и в частности, дискретность наследственных факторов («гипотеза чистоты гамет») и их комбинаторику при сочетании гамет, ак причину расщепления признаков у потомков.

В 1865 г. была доложена, а в 1866 г. вышла из печати работа Г. Менделя «Опыты ад растительными гибридами», однако она осталась незамеченной биологами и стениеводами. И только после независимого переоткрытия менделевских законоерностей наследования в 1900 г. тремя учеными-ботаниками [в Германии Карлом орренсом (1864–1933) на кукурузе, в Австрии Эрихом Чермаком (1871–1962) на рохе и в Голландии Гуго де Фризом (1848–1935) на ослиннике, маке и дурмане] наалось собственно развитие генетики как науки.

Знаменательные открытия 70–80-х гг. XIX века [митоз у растений (Е. Страсбурр) и животных (В. Флемминг); слияние ядер при оплодотворении у растений (Е. трасбургер) и животных (Э. Ван Бенеден, О. Гертвиг); редукционное деление при бразовании гамет (В. Флемминг и Э. Ван Бенеден)] создали базу для развития цилогии и способствовали пониманию цитологических основ менделевских законов аследования признаков.

На базе этих открытий **Август Вейсман** (1834–1914) выдвинул гипотезу о существовании в организме особой наследственной субстанции, названной им зачатковой азмой (половые клетки) в отличие от соматоплазмы (остальные клетки организа). Согласно представлениям А. Вейсмана половые клетки защищены от влияния матических клеток, и поэтому признаки, изменяющие только соматоплазму, не гут наследоваться (принцип ненаследования приобретенных признаков).

В чем же причины длительной задержки развития генетики как самостоятельной уки? С одной стороны, развитие генетики зависит от состояния смежных естественнонаучных дисциплин: анатомии, физиологии, эмбриологии, цитологии, иммулогии, биохимии и др. С другой стороны, поскольку генетический материал имесложную многоуровневую организацию: надмолекулярную (хромосомную) и мокулярную (генную) – для его успешного изучения необходимы тонкие физичеие, химические и математические методы. Их появление стало возможным лишь (X веке.

На протяжении одного столетия (срока, безусловно, малого) генетика сложилась к современная фундаментальная наука, достижения которой используются в мецине, биологической промышленности и сельском хозяйстве.

Часть I

ОБЩАЯ ГЕНЕТИКА

МЕНДЕЛИЗМ

нтие современной генетики началось с открытия Грегором Менделем законо-ностей наследования признаков, с установления того факта, что признаки в по-:тве гибридов не исчезают, а перекомбинируются и передаются в определенных ленных соотношениях следующим поколениям. Перед описанием и анализом тов, проведенных Менделем на горохе в небольшом монастырском садике, да-краткую биографическую справку.

регор Мендель (1822—1884) родился в Силезии в семье крестьянина и так же, как о отец, был искусным садоводом. Чин монаха католического монастыря ордена стинцев не помешал Менделю получить образование в Венском университете и вно участвовать в работе Общества естествоиспытателей г. Брюнна (ныне Брно). 65 г. Мендель доложил на заседании этого общества, а 1866 г. опубликовал в его их работу «Опыты над растительными гибридами». Через три года Мендель был ачен настоятелем Брюннского монастыря и вследствие большой занятости вил свои эксперименты по гибридизации.

Изучая наследование признаков у гибридов гороха, Мендель опирался на опыт іх предшественников, особенно И.Г. Кельрейтера, Т.Э. Найта, О. Сажрэ и Нодэна. Из предложенных ими методических приемов он выбрал наиболее про-сивные (полукастрация цветков, реципрокные и возвратные скрещивания, от-растений с альтернативными признаками) и усовершенствовал гибридологиче-й метод, дополнив его *количественным учетом расщепляющихся форм и матема-ческим анализом полученных результатов.* Все последовательные этапы экспери-тальной работы Менделя были им тщательно продуманы и обоснованы.

1.1. ГИБРИДОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД Г. МЕНДЕЛЯ

ектом исследования Г. Мендель выбрал горох *Pisum sativum*, поскольку это само-ляющееся растение имеет много культурных сортов, стабильно сохраняющих і признаки в потомстве, и обладает таким строением цветков, которое позволяет о удалять пыльники и наносить пыльцу других сортов на рыльце полукастриро-ных цветков.

В течение двух лет Мендель испытывал 34 сорта гороха. Убедившись в течение не-ьких циклов самоопыления в константности выбранных признаков, он выбрал орта с их контрастирующими парами (табл. 1.1).

[illegible]	[illegible]	[illegible] приз[illegible]
Фо[illegible]	Г[illegible]	Морщинистые
Ок[illegible]	Желтые	Зеленые
Окр[illegible]	Пурпурные	Белые
Форма зрелых бобов	Выпуклые	С перетяжками
Окраска зрелых бобов	Желтые	Зеленые
Расположение цветков	Пазушные	Верхушечные
Высота растения	Высокие	Низкие

Всего в опытах Менделем было проанализировано наследование *семи пар* контрастных (альтернативных) признаков. Скрещивания, в которых родительские формы отличаются друг от друга по одной, двум и трем парам альтернативных признаков, позднее стали называться соответственно *моно-*, *ди-* и *тригибридными*.

Во всех скрещиваниях Мендель проводил точный количественный учет всех форм второго поколения, различающихся по отдельным признакам: потомство от каждого растения анализировалось им индивидуально, а затем подсчитывалась суммарная численность по каждому признаку по всей выборке растений.

В опытах Менделя использовались большие выборки растений. В дальнейшем их ***репрезентативность***, т.е. достаточность для получения достоверных результатов, была подтверждена статистическими методами.

1.2. ЗАКОНЫ НАСЛЕДОВАНИЯ ПРИЗНАКОВ, УСТАНОВЛЕННЫЕ Г. МЕНДЕЛЕМ

Усовершенствование гибридологического метода позволило Г. Менделю выявить ряд важнейших закономерностей наследования признаков у гороха, которые, как оказалось впоследствии, справедливы для всех диплоидных организмов, размножающихся половым путем.

Описывая результаты скрещиваний, сам Мендель не интерпретировал установленные им факты как некие законы. Но после их переоткрытия и подтверждения на растительных и животных объектах, эти повторяющиеся при определенных условиях явления стали называть **законами наследования признаков у гибридов**

1.2.1. ЗАКОН ДОМИНИРОВАНИЯ ИЛИ ЕДИНООБРАЗИЯ ГИБРИДОВ ПЕРВОГО ПОКОЛЕНИЯ

В опытах Менделя при скрещивании сортов [illegible] *Pis*[illegible] отличающихся друг от друга по одной паре [illegible] признак[illegible] *пурпур*-

ные или белые цветки), все гибриды первого поколения выглядели одинаково, т.е. имели одинаковый **фенотип**, и были похожи на одного из родителей.

Признаки, проявляющиеся у гибридов первого поколения, Мендель назвал **доминантными** (лат. *dominus* – господствующий), а не проявляющиеся – **рецессивными** (лат. *recessus* – отступающий). Для обозначения признаков он использовал буквы латинского алфавита (для доминантных – прописные, для рецессивных – строчные). Сочетание различных вариантов (аллелей) наследственных задатков какого-либо признака (например, *AA*, *Aa* или *aa*) принято называть *генотипом* по данному признаку. Генотип может быть *гомозиготным* (*AA* или *aa*) и *гетерозиготным* (*Aa*). Понятия **«гомозиготность»** и **«гетерозиготность»** ввел У. Бэтсон в 1902 г.

При изучении взаимодействия аллелей одного наследственного фактора (позднее названного геном) выяснилось, что один и тот же аллель может быть доминантным в одном генотипе и практически не проявляться – в другом. В настоящее время известно, что характер доминирования зависит от внешних условий, возраста, пола, а также других наследственных факторов (так называемая «неустойчивая доминантность») (см. гл. 5). Кроме того, «доминантность» является относительной, поскольку степень доминирования одного и того же гена может быть различной в зависимости от уровня организации биологической системы: молекулы, клетки, организма.

Наряду с полным доминированием Мендель наблюдал проявление промежуточного фенотипа по таким признакам, как размер листьев, опушенность отдельных частей растения и время цветения. В дальнейшем выяснилось, что неполное доминирование (промежуточное наследование) при скрещивании различных организмов наблюдается довольно часто: так у *Antirrhinum majus* (львиный зев) и *Mirabilis jalapa* (ночная красавица) гибриды от скрещивания красноцветковых растений с белоцветковыми имеют промежуточную, розовую окраску.

Феномен доминирования или единообразия особей при скрещивании форм, отличающихся друг от друга по одной паре альтернативных признаков, является общебиологическим законом, поскольку характерен для гибридных форм различных видов организмов. Обычно этот закон называют **«законом единообразия гибридов первого поколения»**, а доминирование считается одним из вариантов его проявления. Закон единообразия гибридов первого поколения справедлив только для диплоидных организмов, у которых любой признак определяется двумя аллелями одного гена. Но временная диплоидность может иметь место и у некоторых прокариот: например, у бактерий *E. coli* при конъюгации, а также у бактериофагов при инфекции бактерий. Вот почему взаимодействие аллелей одного гена можно назвать в некотором смысле универсальным принципом.

1.2.2. ЗАКОН РАСЩЕПЛЕНИЯ ПРИЗНАКОВ

При генетическом анализе для описания схемы скрещивания пользуются определенными правилами. Родительские особи обозначают буквой P (от лат. *parentes* – родители), особи женского пола – знаком ♀ (зеркало Венеры), мужского – знаком ♂ (щит и копье Марса), скрещивание – знаком умножения. Образующееся в результате

Таблица 1.2. **Результаты опытов Менделя по скрещиванию растений гороха, различающихся по одному признаку. Соотношение потомков F_2 с доминантными и рецессивными признаками**

Признак	Доминантный (%)		Рецессивный (%)		Всего (шт.)
Форма семян	Гладкие	74,74	Морщинистые	25,26	7324
Окраска семядолей	Желтая	75,06	Зеленая	24,94	8023
Окраска цветков	Пурпурная	75,90	Белая	24,10	929
Форма зрелых бобов	Выпуклая	74,68	С перетяжками	25,32	1181

скрещивания потомство обозначают буквой F (от лат. *filialis* – сыновний) с соответствующими цифровыми индексами: F_1 – первое, F_2 – второе, F_3 – третье поколение и т.д.

Рассмотрим схему **моногибридного скрещивания**, т.е. такого скрещивания, в котором исходные линии отличаются по одному признаку:

P:	*AA* × *aa*
гаметы	*A* *a*
F_1: (гибриды первого поколения)	*Aa* × *Aa*
гаметы	*Aa* *Aa*
F_2:	*AA* *Aa* *Aa* *aa*
Итого:	*3A_* : *1aa*

Согласно описанному выше закону единообразия гибридов первого поколения, при скрещивании гомозиготных форм *AA* и *aa* у всех гетерозиготных потомков *Aa* проявляется доминантный фенотип А.

При самоопылении растений первого гибридного поколения (F_1) во втором поколении наблюдается расщепление по фенотипу. При этом отношение числа особей с доминантным признаком к числу особей с рецессивным в F_2 составляет 3:1. Описанный феномен носит название **«закона расщепления»**. Черточка, стоящая справа от доминантного аллеля *A_* означает, что вторым в данном генотипе может быть как доминантный (*A*), так и рецессивный (*a*) аллель. Часть формулы генотипа, которая обусловливает развитие признака, называется фенотипическим радикалом. Закон расщепления можно сформулировать и так: у потомков гибридов первого поколения в моногибридных скрещиваниях отношение доминантных признаков к рецессивным равно 3:1.

Результаты численных соотношений в F_2, полученные Менделем при расщеплении по четырем из семи признаков, представлены в табл. 1.2.

Мендель не просто подсчитал соотношение фенотипических классов при расщеплении, но и высказал предположение, что в его основе лежит сочетание двух факторов: равновероятного образования гамет *A* и *a* у гибридов *Aa* первого поколения и равновероятной встречи гамет обоих типов при оплодотворении. Сам Мендель подчеркивал, что открытые им закономерности носят чисто статистический характер и для их подтверждения необходимы большие выборки экспериментального материала.

Когда в начале XX в. американский генетик Томас Гент Морган суммировал данные 15 исследователей, повторявших эксперименты Менделя, выборки по каждому

признаку оказались огромными. Например, по окраске семядолей был произведен 269101 подсчет. Расщепление по этому признаку составило 3.004 : 0.996 (по другим признакам расщепление было так же близко к отношению 3 : 1). В современных исследованиях для того, чтобы оценить значимость наблюдаемого отклонения от теоретически ожидаемого результата, обычно используют метод χ-квадрат. Применив этот метод к данным, представленным в табл. 1.2, можно убедиться, что наблюдаемые в опытах Менделя незначительные отклонения от ожидаемого соотношения были недостоверны.

1.2.3. ГИПОТЕЗА ЧИСТОТЫ ГАМЕТ

Для объяснения закономерностей проявления и расщепления признаков у гибридов второго поколения и в возвратных скрещиваниях Мендель предложил **гипотезу чистоты гамет**, согласно которой, гаметы каждого из родителей несут только по одному из наследуемых факторов. Гибриды первого поколения (*Aa*) дают два типа гамет, в равном соотношении содержащих доминантный (*A*) и рецессивный факторы (*a*). Гибридные растения выглядят одинаково, поскольку действует закон доминирования, или единообразия. Наследственные детерминанты рецессивных признаков в гибридном организме *Aa* не исчезают и не сливаются, а разъединяются с доминантными факторами в очередном цикле образования гамет.

Для упрощения анализа ожидаемых результатов в F_2 используют так называемую решетку Пеннета – таблицу, первые строки и столбцы которой соответствуют различным типам женских и мужских гамет. В каждой из четырех клеток записываются генотипы особей F_2, образующиеся при слиянии этих гамет.

Гаметы ♀/♂	*A*	*a*
A	*AA*	*Aa*
a	*aA*	*aa*

ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ГИПОТЕЗЫ ЧИСТОТЫ ГАМЕТ. Г. Мендель не связывал наследственные факторы и процесс их распределения при образовании гамет с какими-либо конкретными материальными структурами клетки и процессами клеточного деления. Последующее развитие генетики показало, что в гипотезе чистоты гамет задолго до создания хромосомной теории наследственности было предугадано существование генов и механизма мейоза и оплодотворения.

Во время мейоза у гибридного растения F_1 (*Aa*) разные пары хромосом расходятся в дочерние клетки независимо друг от друга, и поэтому при случайном соединении гамет во время оплодотворения образуется три типа зигот, соответствующих трем генотипам особей: *AA*, *Aa* и *aa*. На фенотипическом уровне (фенотип – признаки, проявившиеся у особи) проявятся два признака, определяемые генами *A* и *a*, в соотношении 3:1. Соответственно, в полигибридном скрещивании число классов генотипов можно определить по формуле 3^n, а фенотипов – 2^n, где *n* – число пар аллелей, по которым различаются родительские формы.

Убедительное доказательство правильности идеи о расхождении доминантного и рецессивного аллелей у гетерозигот было получено при помощи так называемого тетрадного анализа, основанного на том, что из материнской клетки образуются четыре гаплоидные гаметы. Этот феномен наблюдается у мхов, дрожжей, дающих на одной из стадий жизненного цикла путем деления материнской клетки тетраду, содержащую 4 гаплоидные споры. При тетрадном анализе индивидуально изучаются все 4 особи, развившиеся из отдельных спор. Тетрады гетерозиготных особей *Aa* всегда содержат 2 споры, которые дают потомков с признаками А и 2 споры, из которых развиваются особи с признаками а. Такой результат демонстрирует расхождение аллелей в разные гаметы на уровне их образования.

1.2.4. ЗАКОН НЕЗАВИСИМОГО КОМБИНИРОВАНИЯ ПРИЗНАКОВ

Рассмотрим этот закон на примере расщепления признаков в дигибридном скрещивании, т.е. таком скрещивании, в котором родительские линии гороха отличались друг от друга по двум признакам: форме семян (гладкие или морщинистые) и их окраске (желтые или зеленые).

Обозначим ген желтой окраски семян – *A*, зеленой окраски – *a*. *A* и *a* представляют собой аллели (альтернативные проявления одного и того же гена) гена *A*. Обозначим ген гладкой формы семян – *B*, морщинистой – *b*.

P *AABB* × *aabb*

желтые гладкие × зеленые морщинистые

гаметы *AB* *ab*

F_1 *AaBb*

желтые гладкие

гаметы F_1	*AB*	*Ab*	*aB*	*ab*
AB	*AABB* AB	*AABb* AB	*AaBB* AB	*AaBb* AB
Ab	*AABb* AB	*Aabb* Ab	*AaBb* AB	*Aabb* Ab
aB	*AaBB* AB	*AaBb* AB	*aaBB* aB	*aaBb* aB
ab	*AaBb* AB	*Aabb* Ab	*aaBb* aB	*aabb* ab

В первом столбце по вертикали и верхней строке по горизонтали решетки Пеннета представлены варианты гамет гибрида первого поколения *AaBb*. В остальных столбцах с левой стороны указана генетическая структура гибрида, т.е. ее генотип, а с правой – те гены, которые проявились у особи, т.е. ее фенотип.

Подсчитав соотношение фенотипических классов во втором поколении, легко убедиться, что оно равняется 9:3:3:1. В опытах Менделя число растений в этом скрещивании составило 315 AB : 108 Ab : 101 aB : 32 ab. На основании раздельного рассмотрения признаков он пришел к выводу, что пара аллелей *A-a* наследуется независимо от *B-b*. Так в этом скрещивании отношение по паре аллелей *A-a* равно 423:133 (3,12:1), по паре аллелей *B-b* – 416:149 (2,97:1). При подсчете величины χ-квадрат это отношение не будет достоверно отличаться от 3:1 по каждой паре аллелей. Полученные результаты Мендель объяснил независимым распределением двух пар

энативных задатков между гаметами, характер распределения которых носит йный характер. После открытия мейоза и характера наследования сцеплен- і несцепленных признаков стало ясно, что цитологической основой выпол- я этого закона являются следующие положения. Во-первых, гены, локализо- ые в разных хромосомах, определяют признаки, наследуемые независимо. торых, негомологичные хромосомы расходятся в анафазе мейоза случайно, висимо и равновероятно, поэтому у дигетерозиготы *AaBb* образуются четыре гамет (*AB*, *Ab*, *aB*, *ab*), каждый – с вероятностью 25%. При сочетании этих га- юлучается 16 комбинаций с соотношением различных классов фенотипов 9 _: 3 A_bb : 3 aaB_ : 1 aabb. При этом по паре аллелей *A-a* из 16 комбинаций юдается соотношение 12 (9 AB + 3 Ab) : 4 (3 aB + 1 ab), аналогично и по паре лей *B-b* – 12 (9 AB + 3 aB) : 4 (3 Ab + 1 ab) или 3:1. Таким образом, независи- ь наследования двух альтернативных пар признаков обусловлена особенно- и комбинаторики и расхождения в мейозе негомологичных хромосом, в кото- локализованы эти гены.

тригибридных скрещиваниях Мендель анализировал признаки формы семян, ски их кожуры и семядолей. Пары альтернативных признаков он обозначил как *B-b*, *C-c*. При этом он вывел формулу, по которой можно подсчитать ожидаемое ношение по фенотипу:

$$(A + 2\,Aa + a) \times (B + 2\,Bb + b) \times (C + 2\,Cc + c).$$

этой формуле Мендель обозначал гибридные формы как *Aa*, *Bb* и *Cc*, а кон- нные (гомозиготные) – одной буквой A, B, C, a, b, c. Генотипы гомозигот потом и записываться с учетом парности аллелей по каждому гену: *AA*, *BB* и т.д. Поэ- менделевскую формулу и ожидаемое соотношение по фенотипу можно пред- ить в ином виде.

$$(AA + 2\,Aa + aa) \times (BB + 2\,Bb + bb) \times (CC + 2\,Cc + cc) =$$
$$27\,A_B_C_ + 9\,aaB_C_ + 9\,A_bbC_ + 9\,A_B_cc + 3\,A_bbcc + 3\,aaB_cc +$$
$$3\,aabbC_ + 1\,aabbcc$$

Наблюдая перекомбинирование по трем парам признаков, Мендель пришел к следу- му выводу: «Потомки гибридов, соединяющих в себе несколько существенно раз- ных признаков, представляют собой членов комбинационного ряда, в котором соеди- ы ряды развития каждой пары различающихся признаков. Этим одновременно дока- ется, что поведение в гибридном соединении каждой пары различающихся призна- не зависимо от других различий у обоих исходных растений».

Таким образом, вне зависимости от типа скрещивания (ди-, тригибридного и при скрещивании гетерозиготных особей, различающихся по двум и более па- генов, каждая пара расщепляется независимо от другой (в соотношении 3:1). сегрегационные отношения определяются законом независимого комбиниро- ия и возможны только при отсутствии сцепления между генами (см. гл. 7), т.е. ализации их в разных хромосомах.

Правильность своих выводов о независимом комбинировании наследственных торов при дигибридном скрещивании Мендель проверил путем скрещивания

гибридных растений F_1 с рецессивной формой, гомозиготной по обеим парам генов (*aabb*). Это скрещивание позже стали называть **анализирующим**:

P	*AaBb* × *aabb*
гаметы:	(*AB*, *Ab*, *aB ab*) × *ab*
Генотипы F_1	*1AaBb*: *1Aabb*: *1aaBb*: *1aabb*
Фенотипы F_1	1AB : 1Ab: 1 aB : 1 ab

В результате такого скрещивания (*AaBb* × *aabb*) получилось четыре типа форм: *AaBb* (желтые гладкие), *Aabb* (желтые морщинистые), *aaBb* (зеленые гладкие), *aabb* (зеленые морщинистые) с численным соотношением 1:1:1:1. Так как во всех четырех скрещиваниях от отцовского сорта передавались одинаковые гаметы (*ab*), то равное число особей во всех четырех группах анализирующего скрещивания является результатом того, что гибриды F_1 (*AaBb*) образовали яйцеклетки *AB*, *Ab*, *aB* и *ab* в равных количествах, а это возможно только на основе независимого комбинирования генов. В случае скрещивания *AABB* × *aabb* в первом поколении не наблюдалось никакого расщепления: все потомки с генотипом *AaBb* имели фенотип родительской формы с доминантными аллелями по обоим признакам. Таким образом, с помощью анализирующего скрещивания можно выявить гомозиготность и гетерозиготность по различным парам аллелей в анализируемых генотипах.

1.2.5. УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ЗАКОНОВ Г. МЕНДЕЛЯ

Для совпадения теоретически ожидаемого соотношения особей определенных фенотипов с реально наблюдаемым, необходимо соблюдение следующих условий:

- гомозиготность исходных форм;
- альтернативное проявление признаков в каждой паре;
- равная вероятность образования у гибрида гамет с разными аллелями;
- одинаковая жизнеспособность разных гамет;
- случайный характер сочетания гамет при оплодотворении;
- одинаковая жизнеспособность зигот с разными комбинациями генов;
- достаточная для получения достоверных результатов численность особей во втором поколении;
- независимость проявления признаков от внешних условий и от остальных генов генотипа в целом.

На практике эти условия, как правило, соблюдаются у большинства организмов, включая человека.

1.3. ДИСКРЕТНОСТЬ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ

Одним из главных достижений Менделя является его экспериментальное доказательство дискретности наследственных факторов, когда каждому признаку соответ-

вует отдельный наследственный фактор (ген). Такой тип наследования позднее ыл назван моногенным, в отличие от полигенного, обусловленного совместным йствием n-числа генов. Дискретность проявляется в расхождении двух аллелей ного гена, локализованных в гомологичных хромосомах, в разные гаметы (принип чистоты гамет). Дискретная локализация генов в разных хромосомах обусловлиет их комбинаторику в мейозе, которая выявляется на фенотипическом уровне в соношении 9:3:3:1 в дигибридном скрещивании. В начале XX века были построены рвые генетические карты у дрозофилы и кукурузы, подтверждающие дискретность нов в хромосомах (см. гл. 7).

Менделевские законы наследования после переоткрытия были подтверждены на южестве различных объектов и, в частности, на классическом генетическом объте – *Drosophila melanogaster*, который используется как в научных исследованиях, к и на практических занятиях студентов, изучающих генетику. Общее, что объединет все объекты, на которых можно убедиться в правильности менделевских законв, – диплоидный набор хромосом в соматических клетках, наличие мейоза с обзованием гаплоидных гамет и равновероятными комбинациями негомологичных юмосом, взаимодействие аллельных генов по типу доминантности/рецессивнои. По законам Менделя наследуются не только нормальные, но и мутантные приаки, в том числе и некоторые болезни у человека (см. гл. 21, посвященную менделирующим моногенным заболеваниям).

Оценивая значение работы Г. Менделя для развития науки, выдающийся отечественный генетик Н.В. Тимофеев-Ресовский писал: «Его (Менделя) величие в том, о, зная и учитывая все явления, открытые (его предшественниками), но точно не юанализированные, он так поставил свои опыты и обработал их результаты, что ног дать точный, количественный анализ наследования и перекомбинирования ементарных наследственных признаков в чреде поколений. Из таким образом полученных экспериментальных данных он смог сформулировать вероятностно-статистические и комбинаторные закономерности наследования. В этом Г. Мендель передил свое время, став пионером истинного внедрения строгого математическоо мышления в биологию и создал основу быстрого и прекрасного по своей стройости развития генетики в нашем веке».

глава

2 ХРОМОСОМНАЯ ТЕОРИЯ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ

Открытые Менделем закономерности наследования признаков предполагали существование дискретных наследственных факторов, определяющих тот или иной фенотип. Однако что представляют собой эти факторы, в каких структурах клетки они локализованы, как влияют на развитие признаков, долгое время оставалось неизвестным. Изучение мейоза и митоза показало, что поведение хромосом при образовании гамет и оплодотворении полностью соответствует гипотетическому поведению абстрактных факторов наследственности, существование которых постулировал Мендель. Отсюда был сделан вывод, что материальным носителем этих факторов являются хромосомы, т.е. была сформулирована **хромосомная теория наследственности**.

В семидесятые-восьмидесятые годы XIX века Э. Страсбургер у растений и В. Флемминг у животных описали деление клетки, которое сейчас мы называем **митозом**. Структурные элементы, обнаруживаемые в ядре при делении, в 1883 г. В. Вальдейер назвал **хромосомами**.

Первые свидетельства в пользу того, что именно хромосомы являются носителями наследственных факторов, были получены в цитологических и эмбриологических исследованиях на рубеже XIX и XX столетий. Особенно большое значение для формирования представлений о роли хромосом в наследственности имеют работы крупного немецкого эмбриолога Т. Бовери (1862–1915). Он первым установил, что у каждого вида животных и растений число и форма хромосом постоянны и по этим признакам виды отличаются друг от друга. Ему также принадлежит мысль о том, что в период интерфазы хромосомы не исчезают, не рассыпаются на зерна хроматина, но сохраняют свою индивидуальность. В изящных экспериментах с развивающимися яйцами морских ежей Т. Бовери показал, что свойства организма определяются содержащимися в ядре хромосомами, а не цитоплазмой. Например, при оплодотворении яйца морского ежа двумя сперматозоидами в первом делении дробления формируются три или четыре полюса. В результате образуются бластомеры, содержащие разное число хромосом, но только те из них, которые имеют полный набор хромосом, могут дать начало нормальным личинкам. Из этих экспериментов следует, что во-первых, именно хромосомы, а не цитоплазма, определяют развитие личинок, а во-вторых, что хромосомы качественно различны, то есть отличаются друг от друга не только по внешнему виду, но «...и по внутреннему наследственному составу». В пользу теории индивидуальности и качественного различия хромосом свидетельствовало и обнаружение половых хромосом. К. Макклант, Э. Вильсон, У. Сэттон и др. обнаружили у самцов разных видов насекомых непарную хромосому, которая попадает только в половину сперматозоидов. К. Маккланг первым предположил, что эта непарная хромосома связана с определением пола. Связь между хромосомами и по-

лом была четко доказана работами Э. Вильсона, в которых он описал два способа хромосомного определения пола у насекомых. В первом случае самки имеют две половые, так называемые X- хромосомы, а самцы только одну. Во втором случае у самок выявляются две X-хромосомы, а у самцов – одна X-хромосома и одна очень мелкая, так называемая Y-хромосома. Позднее половые хромосомы были обнаружены и у других животных. Т. Морган и Р. Гольдшмидт независимо друг от друга предположили, что гены, определяющие развитие пола, должны находиться в половой хромосоме. Разные типы хромосомного определения пола описаны ниже. Современное состояние вопроса о генетическом контроле детерминации пола анализируется в гл. 8. В данной главе мы рассмотрим основные экспериментальные доказательства идеи о том, что наследственные факторы (гены) расположены в хромосомах.

2.1. ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАКОНОВ МЕНДЕЛЯ

2.1.1. КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ

Промежуток жизни клетки от ее образования до деления на две дочерние называют **клеточным циклом.** У разных организмов и в разных тканях продолжительность клеточных циклов различна (табл. 2.1).

Клеточный цикл соматических клеток высших растений и животных можно разделить на две стадии: митоз и интерфазу (рис. 2.1). Под интерфазой понимают период клеточного цикла между концом одного деления и началом следующего, т.е. между двумя последовательными митозами. При световой микроскопии ядра, находящегося на стадии интерфазы, хромосомы как отдельные структуры не видны, а их окрашенное вещество имеет вид гранул, более или менее равномерно распределенных в поле зрения. Интерфазу принято разделять на три периода: G_1 – пресинтетический, S – синтез ДНК и G_2 – постсинтетический. Длительность интерфазы в клетках разных тканей различна, и определяется в основном периодом G_1. Как правило, этот период – самый продолжительный. Примерно в середине G_1 находится контрольная точка, до достижения которой митоз можно заблокировать ингибиторами транскрипции и трансляции. После этой точки клетка неизбежно проходит стадии синтеза ДНК, постсинтетическую – G_2 и митоз. К началу деления клетки ее ДНК реплицирована и каждая хромосома уже состоит из двух идентичных нитей – хроматид, соединенных одной центромерой. Клетки, прекратившие деление, находятся в стадии покоя – G_0.

Таблица 2.1. **Продолжительность клеточного цикла у различных объектов (из: Инге-Вечтомов, 1989)**

Организм	Продолжительность, ч
Кукуруза	12–20
Лук	13–23
Овес	10
Шпинат	25–35
Мышь	
эпителий	11–38
сперматогонии	26–30
Крыса	
печень	14–47,5
эпителий	9–10,5
Человек	
эмбриональные фибробласты	18,5
лейкоциты	18
кожа	28
почка	21–27

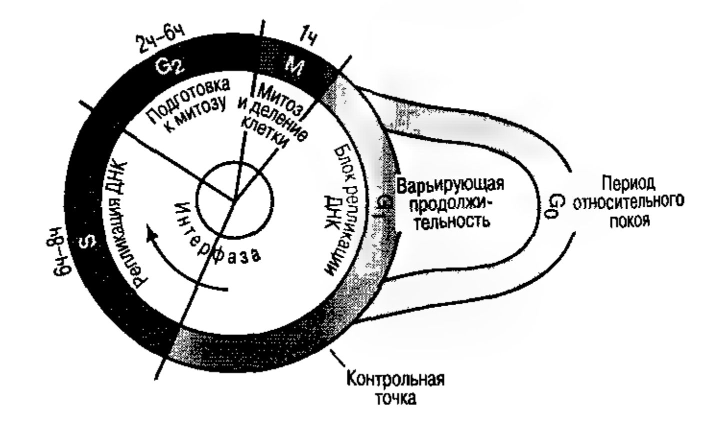


Рис. 2.1. Клеточный цикл. (Из: Griffiths et al., 2000)

2.1.2. МИТОЗ

По морфологии ядра и хромосом, наблюдаемой в световой микроскоп, митоз можно разделить на четыре стадии: профазу, метафазу, анафазу, телофазу.

Профаза. На этой стадии происходит спирализация и конденсация хромосом. В начале профазы они выглядят под микроскопом как тонкие, длинные нити, а к концу укорачиваются и утолщаются. К этому времени становится очевидно, что каждая хромосома состоит из двух хроматид. Центриоли в клетках животных мигрируют к противоположным полюсам, это приводит к формированию полярных структур,

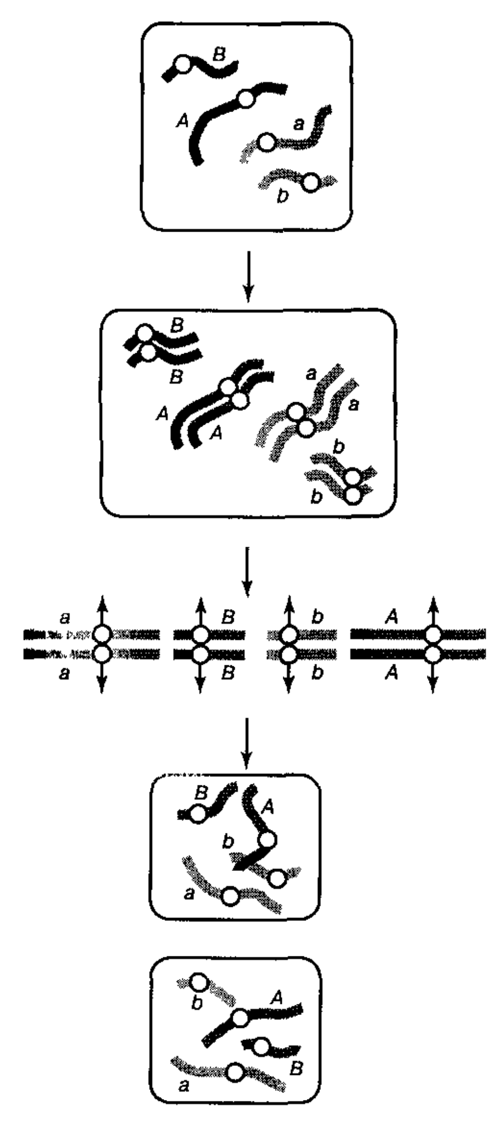


Рис. 2.2. Схема митоза. (Из: Griffiths et al., 2000)

Гены расположены в негомологичных хромосомах.

связанных с аппаратом веретена деления. Нити веретена состоят из микротрубочек, образующихся в результате полимеризации белка тубулина. Одни нити проходят от полюса к полюсу, другие соединяют центромеры и полюс. В конце профазы начинается разрушение ядерной мембраны, и с окончанием профазы она полностью исчезает, завершается формирование веретена деления. На этой стадии можно остановить процесс митоза, подействовав на клетку алкалоидом колхицином.

Метафаза. Во время метафазы центромеры располагаются в экваториальной плоскости клетки, перпендикулярной оси веретена. Плечи хромосом находятся по сторонам этой плоскости, не имея относительно нее какой-либо особой ориентации.

Анафаза. Эта короткая стадия начинается с расщепления центромер; хроматиды перестают удерживаться вместе и становятся самостоятельными хромосомами. Разделившиеся центромеры с помощью нитей веретена расходятся к противоположным полюсам и увлекают за собой плечи хромосом. Предполагается, что движение осуществляется за счет скольжения нитей друг относительно друга по механизму, похожему на движение актиновых и миозиновых филаментов при мышечном сокращении. Нити веретена деления, которые растягивают центромеры к противоположным полюсам, присоединяются к кинетохору – белковой структуре, имеющейся в каждой центромере.

Телофаза. Идентичные наборы хромосом оказываются у противоположных полюсов клетки. Постепенно хромосомы деспирализуются, удлиняются и приобретают вид интерфазного хроматина. Веретено деления исчезает, формируется ядерная мембрана. Затем делится цитоплазма, и образуются две клетки. У животных цитоплазма делится путем перетяжки, у растений, как правило, образуется клеточная стенка. Дочерние клетки могут быть разного размера в зависимости от места обра-

Таблица 2.2. **Продолжительность фаз митоза в минутах (из: Лобашев, 1967)**

Клетки	Профаза	Метафаза	Анафаза	Телофаза
Саркома Иосида	14	31	4	21
Селезенка мыши в культуре	20–35	6–15	8–14	9–26
Нейробласты кузнечика	102	13	9	57
Эндосперм гороха	40	20	12	110

зования перетяжки или клеточной стенки, однако генетическая информация, содержащаяся в их ядрах, идентична, поскольку расходящиеся к противоположным полюсам хроматиды являются точными копиями друг друга (рис. 2.2).

Митоз составляет не более 1/7-1/10 части клеточного цикла. Продолжительность фаз митоза различна в клетках разных тканей. Как правило, профаза – самая длинная стадия митоза, метафаза – самая короткая. В табл. 2.2 представлена продолжительность фаз митоза в разных клетках некоторых организмов.

2.1.3. МЕЙОЗ

Эта форма деления характерна для специализированных клеток половых желез (яичников и семенников). Из диплоидных клеток-предшественников в ходе мейоза образуются гаплоидные гаметы – яйцеклетки и сперматозоиды (число хромосом *n*). Мейоз включает два клеточных деления, перед которыми происходит только одна репликация ДНК. Первое деление называется *редукционным* и обозначается как мейоз I. В результате этого деления из одной диплоидной клетки образуются две гаплоидные. Второе деление называется *эквационным* и обозначается как мейоз II. Это деление подобно митозу, так как сестринские хроматиды отделяются друг от друга и расходятся к разным полюсам. Каждое из двух делений мейоза состоит из профазы, метафазы, анафазы и телофазы.

МЕЙОЗ I. Во время **профазы** I происходит спирализация и укорочение хромосом. Кроме того, гомологичные хромосомы конъюгируют друг с другом по всей длине, образуя **бивалент**. Во время конъюгации хромосом между несестринскими хроматидами может произойти обмен участками – **кроссинговер** (см. гл. 7). В точке обмена образуется видимая в световой микроскоп крестообразная структура, которую называют **хиазмой**. Генетические исследования свидетельствуют о том, что кроссинговер происходит на стадии четырех хроматид, при этом в данной точке обмениваются участками только две из четырех нитей, и хроматиды участвуют в обмене случайно (гл. 7 и 11). Как правило, чем больше длина хромосом, тем больше среднее число образуемых ими хиазм. В электронном микроскопе хорошо видно, как между гомологичными хромосомами в каждом биваленте формируется особая структура – **синаптонемный комплекс** (гл. 11), но в некоторых случаях этот комплекс не образуется и в результате кроссинговер или отсутствует, или сильно подавлен. В частности, синаптонемный комплекс не выявляется у самцов дрозофилы, не происходит у них и кроссинговер. Описаны мутации, приводящие к отсутствию синаптонемного комплекса

профазе I у самок дрозофилы. Например, у самок, гомозиготных по ... исследования олностью подавлен кроссинговер. Электронномикроскопические ... показали, что у них не формируется синаптонемный комплекс.

По морфологии ядра и хромосом, наблюдаемой в световой микроскоп, профазу ервого деления мейоза можно разделить на ряд стадий:

1) *лептотену* (стадия тонких нитей) – в ядре начинают выявляться длинные тонкие нити хромосом вместо гранул хроматина интерфазного ядра;

2) *зиготену* (стадия объединения нитей) – начинается конъюгация гомологичных хромосом;

3) *пахитену* (стадия толстых нитей) – синапс хромосом настолько тесный, что тдельные гомологи в биваленте неразличимы;

4) *диплотену* (стадия двойных нитей) – синапс становиться менее тесным, уже идны хроматиды и хиазмы;

5) *диакинез* – хромосомы максимально укорачиваются, центромеры гомологичных хромосом отталкиваются друг от друга, и хромосомы удерживаются вместе олько в зонах хиазм, исчезают ядрышко и ядерная мембрана, начинает формироваться веретено деления.

Метафаза I. Биваленты выстраиваются в экваториальной плоскости, при этом центромеры ориентируются относительно полюсов случайно.

Анафаза I. Гомологичные хромосомы отделяются друг от друга и движутся к противоположным полюсам. Центромеры не расщепляются, поэтому сестринские хроматиды продолжают удерживаться вместе. Вследствие кроссинговера сестринские хроматиды уже могут быть неидентичными. Таким образом, к полюсам движутся хромосомы, состоящие из двух хроматид. В ходе этой фазы из одной диплоидной клетки образуется две гаплоидные.

Интеркинез. Это стадия между первым и вторым делениями мейоза. У разных видов интеркинез имеет разную продолжительность. Если эта стадия длительна, хромосомы могут декомпактизоваться и принять вид интерфазного хроматина. Важно помнить, что на этой стадии не происходит репликации ДНК.

МЕЙОЗ II. В профазе II восстанавливается веретено деления. Во время метафазы II хромосомы располагаются в экваториальной плоскости. В анафазе II происходит расщепление центромер, и хроматиды каждой хромосомы разделяются и движутся к противоположным полюсам деления. В телофазе II из каждого гаплоидного ядра образуются два, которые содержат гаплоидное число хромосом, состоящих из одной хроматиды каждая.

Таким образом, диплоидная родительская клетка делится на четыре гаплоидные. Генетическое содержимое этих клеток различно. Материнские и отцовские хромосомы могут находиться в них в разных комбинациях, при этом в результате кроссинговера в каждой хромосоме также могут появиться новые комбинации аллелей.

При слиянии разнообразных гамет в процессе оплодотворения возникают новые диплоидные потомки с различными комбинациями отцовских и материнских генов.

В 1902 г. У. Сэттон и Т. Бовери, сопоставляя поведение хромосом в мейозе и поведение признаков при передаче их от родителей потомкам, пришли к предположению, что менделевские наследственные факторы (гены) расположены в хромосомах. Их гипотеза основывалась на сходстве поведения генов и хромосом при образовании гамет и зигот.

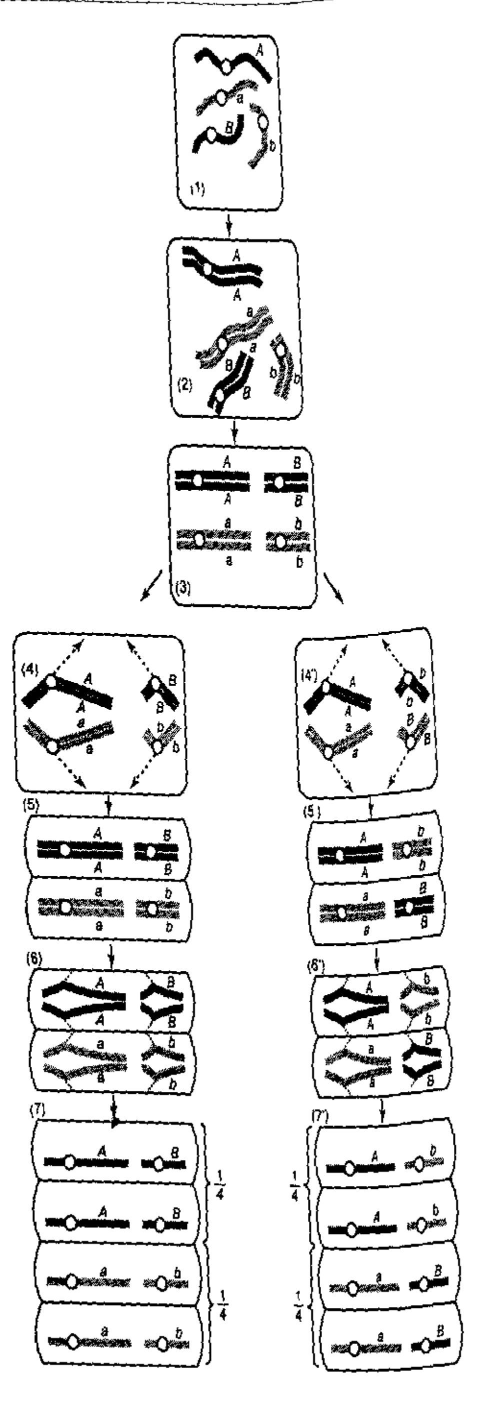


Рис. 2.3. Схема мейоза. (Из: Griffiths et al., 2000)

Гены расположены в негомологичных хромосомах.

1. В ядре каждой соматической клетки содержится по две гомологичные хромосомы. Каждая соматическая клетка несет по два аллеля одного гена.

2. Гомологичные хромосомы в профазе мейоза конъюгируют и в норме обязательно расходятся к противоположным полюсам веретена деления. Следовательно, гаметы несут только по одной хромосоме из каждой пары. Так же и аллели одного гена при образовании гамет обязательно попадают в разные гаметы, каждая гамета несет только один из аллелей (правило чистоты гамет).

3. При оплодотворении из гаплоидных гамет образуется диплоидная зигота, восстанавливается диплоидное число хромосом. Одну из гомологичных хромосом зигота получает от матери, вторую – от отца. То же известно и о генах: каждый организм имеет два аллеля одного гена, причем один аллель получен от матери, второй – от отца.

4. Ориентация негомологичных хромосом к полюсам случайна, гаметы могут иметь все возможные комбинации хромосом: как все отцовские или все материнские, так и разные сочетания отцовских и материнских хромосом. То же известно и о генах: неаллельные гены наследуются независимо (рис. 2.3).

Параллелизм поведения хромосом и генов в процессе клеточного деления указывает на то, что гены – составная часть хромосом.

Доказательства хромосомной локализации генов были получены Т. Морганом (1910 г.) и К. Бриджесом (1916 г.) при изучении наследования признаков, сцепленных с полом, у дрозофилы.

2.2. ХРОМОСОМНЫЕ ТИПЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА

Наборы хромосом в клетках самок и самцов у многих видов различаются. Все пары хромосом кроме одной представлены морфологически идентичными гомологичными экземплярами. Их называют **аутосомами**. Лишь одна пара хромосом является гетероморфной. Такие хромосомы называют **половыми** и обозначают как **X** и **Y**. Половые хромосомы отличаются друг от друга не только по морфологии, в них очень мало общих генов. Например, у дрозофилы найден только один ген *bobbed*, расположенный и в X-, и в Y-хромосоме. Гены, локализованные в половых хромосомах человека, описаны в гл. 8. Наборы аутосом у самок и самцов одинаковы.

У некоторых видов самцы имеют X- и Y-хромосомы, а самки – две X-хромосомы. Таковы наборы половых хромосом у дрозофилы и у млекопитающих, в том числе у человека. У других видов, наоборот, самцы несут две морфологически одинаковые половые хромосомы, а самки – гетероморфны. Такой тип хромосомного определения пола характерен для птиц и некоторых представителей отряда Lepidoptera (Бабочки) (например, для тутового шелкопряда). У ряда видов вообще нет Y-хромосомы: особи одного пола имеют две одинаковые X-хромосомы, другого – только одну X-хромосому.

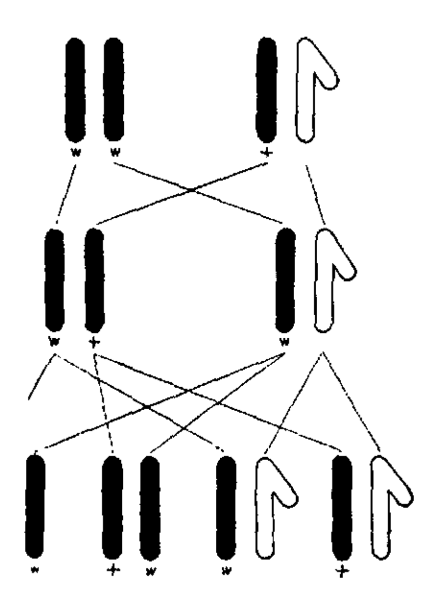
Таблица 2.3. Типы хромосомного определения пола у животных

Вид	Гетерогаметный пол	Набор половых хромосом	
		Самцы	Самки
Человек, дрозофила	Мужской	XY	XX
Клопы (*Protenor*), кузнечик	Мужской	X0	XX
Птицы, бабочки (*Bombyx*)	Женский	XX	XY
Бабочки (*Fumea*)	Женский	XX	X0

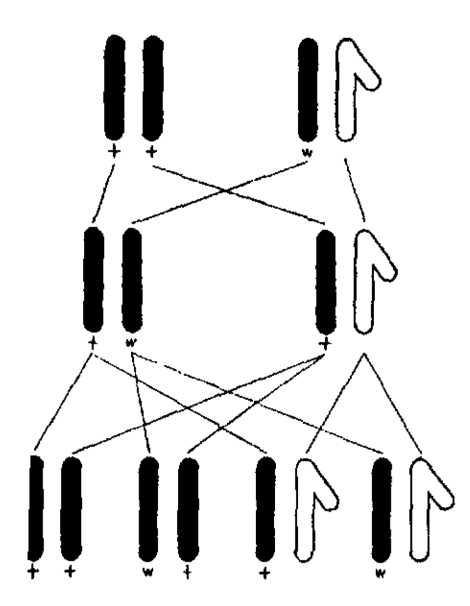
Тот пол, в геноме которого содержатся две морфологически одинаковые половые хромосомы, называется *гомогаметным*. Все гаметы особей этого пола одинаковы по половым хромосомам. Пол, образующий гаметы разные по набору половых хромосом, называется *гетерогаметным*. Это особи, содержащие или морфологически разные половые хромосомы X и Y, или только одну половую хромосому X (табл. 2.3). Так у человека гомогаметный пол – женский. Все яйцеклетки содержат гаплоидный набор аутосом и одну X-хромосому. Сперматозоиды могут быть двух типов. Половина из них помимо гаплоидного набора аутосом несет X-хромосому, половина – Y-хромосому. У кузнечика, так же как и у человека, женский пол гомогаметный, а мужской – гетерогаметный, однако в данном случае ситуация иная: женские особи (XX) производят гаметы с X-хромосомой, а мужские особи (XO) продуцируют сперматозоиды с X-хромосомой либо без нее. У кур гетерогаметным является женский пол (XY), а гомогаметным – мужской (XX). При случайном оплодотворении зиготы двух типов (XX или XY у человека и у кур; XX и XO у кузнечика) образуются в равном количестве. Таким образом, соотношение полов должно быть равно 1:1. Отклонение от этого соотношения может быть вызвано систематическим нарушением процесса мейоза, приводящим к неравновероятному попаданию половых хромосом в гаметы, а также разной жизнеспособностью гамет и зигот с различными наборами половых хромосом.

2.3. НАСЛЕДОВАНИЕ ПРИЗНАКОВ, СЦЕПЛЕННЫХ С ПОЛОМ

В этом и последующих разделах мы рассмотрим эксперименты с дрозофилой, выполненные в лаборатории Т.Г. Моргана им самим и его сотрудниками. Первой мутантной линией дрозофилы была линия *white* (у самок и самцов этой линии глаза белого цвета). У мух дикого типа глаза красные. Закономерности наследования этого признака впервые были описаны в статье Т.Г. Моргана в 1910 г. При скрещивании красноглазых самок с белоглазыми самцами все потомство F_1 оказалось единообразным: и самки, и самцы, имели красные глаза. Именно такого результата следовало ожидать, если признак красные глаза – доминантный. Во втором поколении в потомстве наблюдалось расщепление: 3/4 мух имели глаза красные, 1/4 – белые, при этом среди самок расщепления по цвету глаз не было (у всех самок глаза красные), а



:. 2.4. Схема скрещивания самок w/w мцами $w^{+}Y$. (По: Sturtevant & Beadle, 2)



іс. 2.5. Схема скрещивания самок $/w^{+}$ с самцами wY. (По: Sturtevant & adle, 1962)

среди самцов половина имела красные глаза, половина – белые. Анализирующие скрещивания красноглазых самок из F_2 показали, что половина из них гетерозиготна и несет рецессивный аллель белых глаз, половина гомозиготна по доминантному аллелю красных глаз. Белоглазые самцы из F_2 несут только аллель белых глаз, красноглазые – только аллель красных глаз.

При скрещивании белоглазых самок с красноглазыми самцами, т.е. в обратном скрещивании, все самки F_1 имели красные глаза, а самцы – белые. Таким образом, уже в первом поколении наблюдалось расщепление, при этом распределение признака было различным у самок и самцов. Все дочери имели тот же признак, что их отцы, а сыновья – тот же признак, что их матери. Такой тип наследования назвали **крисс-кросс** (крест-накрест) **наследованием**. Во втором поколении (F_2) появляются белоглазые и красноглазые самки в соотношении 1:1, а также белоглазые и красноглазые самцы в соотношении 1:1.

Эти результаты полностью согласуются с предположением, что ген, определяющий цвет глаз, расположен в X-хромосоме, при этом в Y-хромосоме аллель этого гена отсутствует. На рисунках 2.4 и 2.5 видно, что дочери получают по одной X-хромосоме от матери и от отца (поэтому гетерозиготные дочери имеют доминантный фенотип), единственная X-хромосома сыновей получена ими от матери. Сыновья не могут быть гетерозиготными по генам, локализованным в X-хромосоме, так как имеют только один из аллелей каждого такого гена. Признаки, наследующиеся в соответствии с такими закономерностями, называются **сцепленными с полом**.

Признак «белые глаза» наследуется в полном соответствии с закономерностями передачи потомкам X-хромосомы. Установление связи между наследованием конкретного гена *white* и конкретной хромосомы X послужило веским доводом в пользу хромосомной гипотезы наследственности.

2.4. НЕРАСХОЖДЕНИЕ ПОЛОВЫХ ХРОМОСОМ

2.4.1. ПЕРВИЧНОЕ НЕРАСХОЖДЕНИЕ

Дополнительные доказательства хромосомной локализации генов были получены К.Бриджесом в 1916 г. при изучении аномалий наследования гена *white* у дрозофилы. В предыдущем разделе мы отметили, что при скрещивании белоглазых самок с красноглазыми самцами наблюдается крисс-кросс-наследование: все дочери оказываются похожими на отца – (красноглазые), а все сыновья – на мать (белоглазые). Однако очень редко, примерно 1–2 на две тысячи мух, появляются исключительные потомки: красноглазые самцы и белоглазые самки. Бриджес предположил, что такое отклонение от закономерностей наследования сцепленного с полом признака white можно объяснить редким явлением нерасхождения хромосом в мейозе у самок. Нерасхождение хромосом у нормальных диплоидных самок называется **первичным нерасхождением.** Если по каким-либо причинам X-хромосомы самки не расходятся в анафазе 1 к разным полюсам, а попадают к одному полюсу, может образоваться яйцеклетка с двумя X-хромосомами (причем каждая несет аллель белых глаз) или яйцеклетка без X-хромосом (табл. 2.4). Белоглазые самки появляются при оплодотворении яйцеклетки с двумя X-хромосомами, полученными от матери, сперматозоидом с Y-хромосомой. Следовательно, они должны иметь набор половых хромосом XXY. Красноглазые самцы являются результатом оплодотворения яйцеклетки без X-хромосом сперматозоидом, несущим X-хромосому отца и, следовательно, имеют набор половых хромосом XO. Изучив кариотипы «исключительных» мух, Бриджес полностью подтвердил свою гипотезу. «Исключительные» самки имели две X-хромосомы и одну Y-хромосому, «исключительные» самцы – всего одну X-хромосому. Таким образом, было показано, что нарушение закономерностей наследования признака, сцепленного с полом, связано с нарушением поведения половых хромосом в мейозе. Это однозначно свидетельствовало о том, что ген *white* расположен в X-хромосоме.

Таблица 2.4. **Генотипы и фенотипы потомков при первичном нерасхождении X-хромосом у самок дрозофилы**

Гаметы самки		Гаметы самца	
		w^+	Y
Регулярные	*w*	w/w^+ самки, красные глаза	*w*/Y самцы, белые глаза
Исключительные	*w*/*w*	$w/w/w^+$ самки нежизнеспособны	*w*/*w*/Y самки, белые глаза
	0	$w^+/0$ самцы, красные глаза	Y0 нежизнеспособны

2.4.2. ВТОРИЧНОЕ НЕРАСХОЖДЕНИЕ

Нерасхождение X-хромосом у самок XXY называют **вторичным нерасхождением.** При скрещивании белоглазых самок XXY с нормальными красноглазыми самцами XY в потомстве появляется около 4% исключительных мух: белоглазых самок и красноглазых самцов. Остальные потомки (их называют регулярными) – это красноглазые самки и белоглазые самцы.

Во время мейоза у самок XXY возможны два типа конъюгации и расхождения хромосом (табл. 2.5). В результате могут образоваться яйцеклетки, содержащие только одну X-хромосому, и яйцеклетки, содержащие две половые хромосомы: X и Y. При оплодотворении этих яйцеклеток сперматозоидами с X-хромосомой должны появиться красноглазые самки двух типов: половина самок с набором XX и половина – с набором XXY. Цитологический анализ подтвердил это. При оплодотворении яйцеклеток сперматозоидом, несущим Y-хромосому, должны появиться белоглазые самцы, причем половина из них должна иметь набор XY, а половина – XYY. Цитологический анализ подтвердил и это. Если в яйцеклетку попадают две X-хромосомы самки, то при оплодотворении такой яйцеклетки сперматозоидом с Y-хромосомой в потомстве должны обнаруживаться «исключительные» белоглазые самки с набором хромосом XXY. При оплодотворении яйцеклетки, в которую попала только Y-хромосома самки, сперматозоидом, несущим X-хромосому, должны появиться красноглазые самцы XY. Цитологический анализ показал, что «исключительные» мухи и в этом случае – результат нерасхождения половых хромосом у самок XXY.

В 1922 г. Лилиан Морган обнаружила самок дрозофилы, у которых частота нерасхождения X-хромосом составляла 100%, т.е. у них обе X-хромосомы всегда отходили к одному полюсу деления, и, следовательно, формировались яйцеклетки двух типов: содержащие обе X-хромосомы и не содержащие X-хромосом. Эти самки кроме того были гомозиготны по гену *yellow* (*y*), обусловливающему желтую окраску тела и ще-

Таблица 2.5. **Генотипы и фенотипы потомков при вторичном нерасхождении X-хромосом у самок** $w/w/Y$

Вариант конъюгации и расхождения хромосом	Гаметы самки	Гаметы самца	
		X	Y
Две X-хромосомы конъюгируют и расходятся, Y-хромосома распределяется случайно	X	w/w^+ самки, красные глаза	w/Y самцы, белые глаза
	XY	$w/w^+/Y$ самки, красные глаза	$w/Y/Y$ самцы, белые глаза
Одна X и Y хромосомы конъюгируют и расходятся, вторая X-хромосома распределяется случайно	XX	$w/w/w^+$ самки, нежизнеспособны	$w/w/Y$ самки, белые глаза
	Y	w^+/Y самцы, красные глаза	YY нежизнеспособны
	X	w/w^+ самки, красные глаза	w/Y самцы, белые глаза
	XY	$w/w^+/Y$ самки, красные глаза	$w/Y/Y$ самцы, белые глаза

тинок. При скрещивании таких самок с самцами, имеющими нормальную окраску тела и щетинок, дочери всегда были похожи на мать, а сыновья всегда были похожи на отца. Цитологический анализ показал физическое сцепление Х-хромосом у таких самок. В их наборе хромосом обнаруживалась одна большая метацентрическая хромосома, состоящая из двух Х-хромосом, и одна Y-хромосома.

Таким образом, сопоставление наследования признаков, сцепленных с полом, и нормального и аберрантного поведения половых хромосом, однозначно свидетельствовало о том, что гены, отвечающие за эти признаки, расположены в Х-хромосоме.

2.5. ХРОМОСОМЫ – ГРУППЫ СЦЕПЛЕНИЯ ГЕНОВ

Число признаков, наследование которых соответствует менделевским закономерностям, много больше, чем число пар хромосом. Следовательно, в одной хромосоме должно находиться много генов, контролирующих разные признаки. Гены, расположенные в одной хромосоме, должны чаще наследоваться вместе, т.е. для них должен нарушаться закон Менделя о независимом наследовании. На заре развития генетики это был аргумент против хромосомной гипотезы наследственности. Однако по мере накопления данных ствновилось все более очевидным, что закон независимого наследования действительно соблюдается не для любых пар признаков. Феномен сцепления впервые установили в 1906 г. У. Бэтсон и Р. Пеннет, изучая наследование некоторых призиаков у душистого горошка. Они обнаружили, что у гибридов фактор, определяющий развитие удлиненных пыльцевых зерен (L), чаще попадает в те гаметы, куда попал и фактор фиолетовой окраски (В). Такое совместное наследование они назвали *гаметическим сцеплением*. Для других признаков, например, для окраски цветка и формы паруса, наоборот, было обнаружено, что фактор фиолетовой окраски (В) и фактор прямого паруса (Е) редко попадают в одну гамету. Бэтсон предположил, что в этом случае происходит «*гаметическое отталкивание*» факторов друг от друга. Явления притяжения и отталкивания Бэтсон и Пеннет объяснили увеличением числа гамет, несущих определенные сочетания наследственных факторов. Они никак не связали эти явления с хромосомной гипотезой наследственности.

Классическими исследованиями сцепленного наследования явились работы Т. Моргана и его сотрудников на дрозофиле. Довольно быстро у дрозофилы было обнаружено и проанализировано наследование сотен мутаций, изменяющих разнообразные признаки. Все гены можно было разделить на четыре группы, которые назвали группами сцепления. Число групп сцепления равно числу пар хромосом. Одна группа включала гены, контролирующие признаки, сцепленные с полом, две большие группы и одна малочисленная – гены, контролирующие признаки, наследующиеся по менделевским правилам. Гены, относящиеся к одной группе, наследуются сцепленно, т.е. потомки чаще несут родительские комбинации признаков. Гены, принадлежащие к разным группам, наследуются независимо. У дрозофилы четыре пары хромосом и четыре группы сцепления, причем число генов, обнаруженных для каждой группы сцепления, коррелировало с длиной хромосомы.

Тот факт, что расположение генов в одной хромосоме приводит к нарушению заономерностей независимого наследования, можно показать для генов, локализоанных в Х-хромосоме. Рассмотрим опыты А. Стертеванта по изучению совместноэ наследования признаков «белые глаза» (ген *w*) и «желтое тело» (ген *y*). Легко поазать, что гены, определяющие эти признаки, расположены в Х-хромосоме. Если ъмок *y w*/*y w*, гомозиготных по рецессивным генам, скрестить с самцами дикого тиа, $y^+ w^+$/Y в потомстве появятся самцы с фенотипом *y w* (желтое тело и белые гла-і) и гетерозиготные самки дикого типа. Скрещивание самок и самцов F_1 является нализирующим, оно позволяет установить частоты гамет разных типов, образуеіых гетерозиготными самками. В F_2 было получено:

P	♀ *y w*/*y w* × ♂ $y^+ w^+$/Y	
F_1	♀ *y w*/$y^+ w^+$ × ♂ *y w*/Y	
F_2	Фенотип	Число потомков
	+ +	8093
	+ *w*	93
	y +	81
	y w	6672
	Всего	14939

Подавляющее большинство потомков (+ + и *y w*) имеет родительские комбинации енов. Число потомков + *w* и *y* +, с новыми комбинациями генов (рекомбинантные поомки) составляет всего 1,2%. Итак, новые комбинации появились, но не в том соотошении, которое ожидается при независимом наследовании признаков (1:1:1:1).

Скрещивание желтых самок с белоглазыми самцами в F_1 дает гетерозиготных саюк, но в отличие от предыдущего случая мутации *y* и *w* находятся у них в *транс*-поюжении, т.е. в разных хромосомах. Анализирующее скрещивание дало следующие езультаты:

P	♀ $y w^+$/$y w^+$ × ♂ $y^+ w$/Y	
F_1	♀ $y w^+$/$y^+ w$ × ♂ *y w*/Y	
F_a	Фенотип	Число потомков
	+ +	86
	+ *w*	4292
	y +	4605
	y w	44
	Всего	9027

Вновь родительские комбинации признаков (+ *w* и *y* +) обнаруживаются у большинства потомков, а рекомбинантные (+ + и *y w*) – только у 1,4%. Доли рекомбиіантных потомков в двух экспериментах практически равны. Показано, что для каждой пары сцепленных генов характерна определенная доля рекомбинантных поомков, не зависящая от направления скрещивания и родительских комбинаций геюв. Для разных генов частота рекомбинации варьирует от 0 до 50%. На основании зучения частот рекомбинации между сцепленными генами строят генетические арты хромосом (гл. 7).

2.6. ТЕОРИЯ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ Т.Г. МОРГАНА

Суммируя данные о независимом и сцепленном наследовании признаков, о наследовании, сцепленном с полом, о связи нарушения поведения хромосом и отклонения от закономерностей наследования признаков у дрозофилы и других организмов, Морган и его сотрудники сформулировали основные положения хромосомной теории наследственности.

- Гены расположены в хромосомах линейно.
- Гены, расположенные в одной хромосоме, образуют группу сцепления, вследствие чего они наследуются вместе.
- Между гомологичными хромосомами может происходить кроссинговер, благодаря чему образуются новые сочетания генов.
- Сила сцепления обратно пропорциональна расстоянию между генами.

Какие именно компоненты хромосом являются генами, каковы размеры генов и их внутренняя структура еще предстояло выяснить.

2.7. ТИПЫ НАСЛЕДОВАНИЯ ПРИЗНАКОВ

Характер наследования, прослеживаемый в череде поколений, определяется тем, доминантный или рецессивный признак исследуется, и в какой хромосоме локализован ген, контролирующий этот признак. При появлении потомка, несущего признак, которого не было ни у родителей, ни у других изученных предков, возникает ряд вопросов: наследственный ли это признак, является ли он проявлением новой доминантной мутации или результатом гетерозиготности родителей по рецессивной мутации? Для ответа на эти вопросы необходимо проанализировать результаты реципрокных (F_1 и F_2), возвратных и анализирующего скрещиваний. Если в одном скрещивании самки имеют признак А, а самцы – а, а в другом наоборот: самки несут признак а, а самцы – А, то эти скрещивания называются **реципрокными.** Одно из них – прямое, другое – обратное. Нет общепринятого правила, какое направление считать прямым, а какое – обратным, важно, чтобы фенотипы родителей в этих скрещиваниях реципрокно различались. В данном пособии «прямым» принято считать такое направление, когда доминантный признак вносят матери. **Возвратными** называют скрещивания гибридов первого поколения (F_1) с родительскими формами. Термин «анализирующее скрещивание» определен в гл. 1. На основании результатов скрещиваний можно определить 5 типов наследования признаков: *аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный, сцепленный с полом доминантный, сцепленный с полом рецессивный и голандрический.*

У человека типы наследования признаков устанавливаются при изучении семейных родословных с помощью клинико-генеалогического метода. Для определения характера наследования того или иного заболевания необходимо ответить на несколько вопросов: проявляется ли данный признак в каждом поколении, с одинаковой ли частотой данная болезнь встречается у мужчин и женщин и каково соотношение больных и здоровых (гл. 19 и 21). Изучение родословных дает возможность, хотя и не всегда, определить тип наследования.

Следует отметить, что деление признаков на доминантные и рецессивные довольно условно и часто зависит от уровня анализа их проявления. Доминантность и рецессивность зависят не только от взаимодействия аллелей данного гена, но и от влияния других генов, а также от условий внешней среды.

2.7.1. АУТОСОМНО-ДОМИНАНТНЫЙ ТИП НАСЛЕДОВАНИЯ

Для этого типа наследования характерны следующие особенности:

- проявление признака в каждом поколении;
- проявление признака вне зависимости от пола;
- одинаковые соотношения фенотипов самок и самцов в F_1 и в F_2 прямого и обратного скрещивания.

Ниже, приведена схема прямого и обратного скрещивания мутантных *W/W* и нормальных +/+ мух. Предлагаемые схемы скрещиваний базируются на генетической номенклатуре дрозофилы. Гену принято давать полное название, состоящее из одного или нескольких английских слов, отражающих его основное фенотипическое проявление, и символ. Символ гена всегда начинается с той же буквы, что и полное название. При этом название мутантного доминантного аллеля пишется с заглавной буквы, а рецессивного – со строчной. Например, у дрозофилы ген *Wrinkled*, обозначаемый символом *W*, определяет развитие доминантного признака «нерасправленные, сморщенные крылья»; ген *brown*, символ *bw*, определяет развитие рецессивного признака «коричневые глаза». Нормальные аллели, контролирующие развитие признаков дикого типа, обозначают знаком +. При этом возможны два способа написания: или знак + в надстрочном индексе W^+, или просто +. Наклонная черта обозначает гомологичные хромосомы.

Прямое скрещивание
P: ♀ *W/W* × ♂ +/+
F_1: ♀ *W/*+ × ♂ *W/*+
F_2: ♀ и ♂ 1/4 *W/W*; 1/2 *W/*+; 1/4 +/+

Обратное скрещивание
P: ♀ +/+ × ♂ *W/W*
F_1: ♀ *W/*+ × ♂ *W/*+
F_2: ♀ и ♂ 1/4 *W/W*; 1/2 *W/*+; 1/4 +/+

Как видно из схемы, мутантный признак *Wrinkled* проявляется в гетерозиготном состоянии у гибридов первого поколения. В первом и втором поколении признак проявляется вне зависимости от пола, и соотношения фенотипов одинаковы в прямом и обратном скрещиваниях. Сходство результатов прямого и обратного скрещиваний свидетельствует об аутосомном типе наследования. Таким образом, *Wrinkled* – доминантный признак, развитие которого определяется аутосомным геном.

У некоторых видов животных, например, крупных млекопитающих, сельскохозяйственных животных, постановка экспериментальных скрещиваний невозможна.

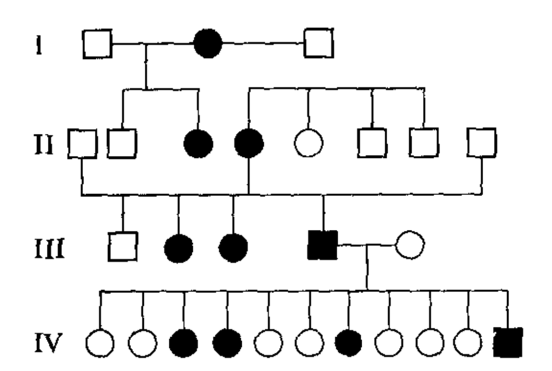


Рис. 2.6. Наследование извитой шерсти у айрширской породы крупного рогатого скота. (Из: Хатт, 1969)

Квадратами обозначены особи мужского пола, кружками особи женского пола, римские цифры указывают номера поколений. Черные кружки и квадраты – животные с извитой шерстью.

В таких случаях составляют родословные, в которых прослеживается наследование признака в нескольких поколениях. На рис. 2.6 приведена родословная, иллюстрирующая наследование извитости шерстного покрова у айрширской породы крупного рогатого скота. Из родословной видно, что признак присутствует в каждом поколении и его проявление не зависит от пола, что является свидетельством аутосомно-доминантного типа наследования.

2.7.2. АУТОСОМНО-РЕЦЕССИВНЫЙ ТИП НАСЛЕДОВАНИЯ

Для этого типа наследования характерны следующие особенности:

- отсутствие признака у гибридов первого поколения;
- проявление признака вне зависимости от пола в F_2 любого направления скрещивания;
- проявление рецессивного признака у 1/4 потомков при скрещивании гетерозиготных родителей (*Аа* × *Аа*) или у 1/2 – при анализирующем скрещивании (*Аа* × *аа*).

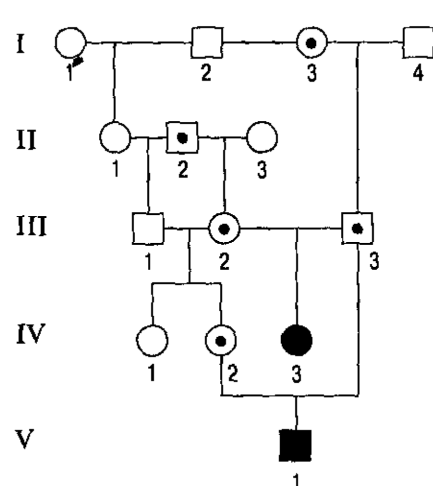


Рис. 2.7. Наследование отсутствия шерстного покрова у гернсейской породы крупного рогатого скота. (Из: Хатт, 1969)

Точки внутри кружков и квадратов указывают на предполагаемое гетерозиготное носительство мутантного гена, животные в каждом поколении пронумерованы арабскими цифрами слева направо.

Эти особенности проявляются у W^+ – рецессивного аллеля гена W (см. схему выше).

По аутосомно-рецессивному типу наследуется отсутствие шерсти у телят гернсейской породы. На родословной, представленной на рис. 2.7, видно, что IV.3 и V.1 имеют общего отца III.3. Кровнородственное скрещивание увеличило вероятность передачи общего мутантного гена от I.3 к потомкам в четвертом и пятом поколениях. В них родились бесшерстные телята как мужского, так и женского пола от здоровых родителей, что возможно только при аутосомно-рецессивном типе наследования мутантного признака.

2.7.3. ДОМИНАНТНЫЙ, СЦЕПЛЕННЫЙ С ПОЛОМ ТИП НАСЛЕДОВАНИЯ

Особенности доминантного сцепленного с полом типа наследования можно рассмотреть на примере гена *Confluens*, Co (толстые, дельтовидные жилки на крыле) у дрозофилы. В прямом скрещивании самки и самцы первого поколения имеют мутантный фенотип (см. схему). Во втором поколении наблюдается расщепление 3/4 *Co* :1/4 Co^+. При этом нормальный фенотип (Co^+) проявляется только у самцов. В обратном скрещивании в первом поколении наблюдается крисс-кросс-наследование: дочери похожи на отца, а сыновья – на мать. Соотношение мутантных и нормальных особей в первом и втором поколениях составляет 1:1. Различные расщепления по фенотипу при разных направлениях скрещиваний свидетельствуют о сцепленном с полом наследовании (о роли Y– хромосомы в детерминации пола см. в гл. 8).

Прямое скрещивание

P: ♀ *Co/Co* × ♂ +/Y
F_1: ♀ *Co*/+ × ♂ *Co*/Y
F_2: 1/4 ♀ *Co/Co*; 1/4 ♀ *Co*/+; 1/4 ♂ *Co*/Y; 1/4 ♂ +/Y

Обратное скрещивание

P: ♀ +/+ × ♂ *Co* / Y
F_1: ♀ +/Co × ♂ +/Y
F_2: 1/4 ♀ +/+; 1/4 ♀ +/*Co*; 1/4 ♂ +/Y; 1/4 ♂ *Co*/Y

2.7.4. РЕЦЕССИВНЫЙ, СЦЕПЛЕННЫЙ С ПОЛОМ ТИП НАСЛЕДОВАНИЯ

Для этого типа наследования характерны следующие особенности (речь идет о видах, у которых женские особи несут две X-хромосомы, а мужские – XY):

- проявление рецессивного признака только у самцов F_2 в прямом скрещивании (самки, гомозиготные по доминантному аллелю с самцами, гемизиготными по рецессивному аллелю) или передача признака от «деда» к «внуку»;
- крисс-кросс-наследование признаков, т.е. передача признака противоположному полу при скрещивании гомозиготной по рецессивному аллелю самки с самцом, гемизиготным по доминантному аллелю (обратное скрещивание);
- различное расщепление по фенотипу в F_2 при разных направлениях скрещиваний. Проявление рецессивного признака в F_2 у 1/4 особей при прямом направлении и у 1/2 особей как в F_1, так и в F_2 при обратном направлении скрещивания. По такому типу наследуется, например, мутация *white* у дрозофилы (см. разд. 2.3)

По рецессивному, сцепленному с полом типу наследуется гемофилия у человека и у собак. На рис. 2.8 приведена родословная кейрн-терьеров, в которой прослеживается наследование гемофилии типа В, или болезни Кристмаса. Видно, что от этого заболевания страдают в основном особи мужского пола, и заболевание передается от самок-носительниц рецессивного гена к половине их сыновей.

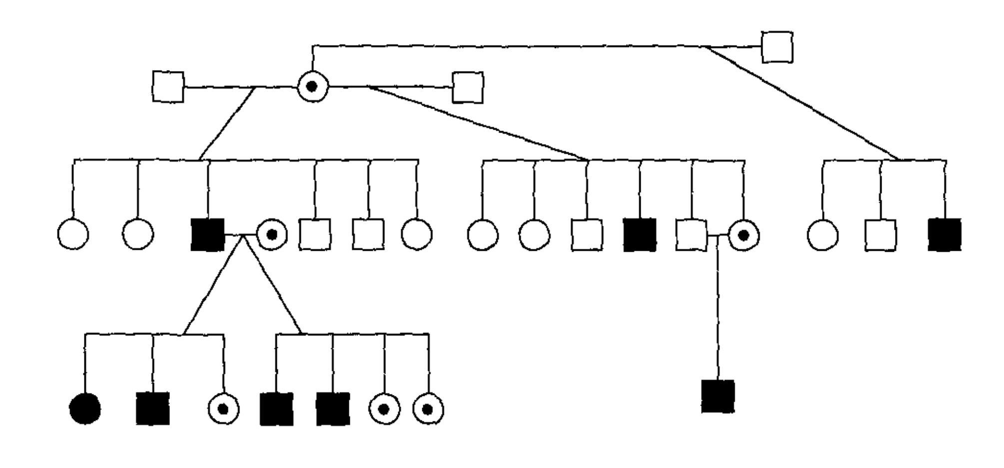


Рис. 2.8. Наследование сцепленной с полом гемофилии у кейрн-терьеров. (Обозначения см. рис. 2.6 и рис. 2.7)

2.7.5. ГОЛАНДРИЧЕСКИЙ ТИП НАСЛЕДОВАНИЯ

Для этого типа наследования характерна передача признака от отца к сыну. Y-хромосома человека в основном генетически инертна. Определены функции всего нескольких генов Y-хромосомы, контролирующих детерминацию пола, формирование яичек и процесс сперматогенеза (гл. 8). Из морфологических признаков, наследуемых сцепленно с Y-хромосомой, наиболее известна волосатость ушей. Возможно, со временем будут выявлены и другие признаки.

лава

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

3.1. ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О ГЕНЕ

3.1.1. ДИСКРЕТНОСТЬ ЕДИНИЦ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ – ФАКТОРОВ ПО Г. МЕНДЕЛЮ

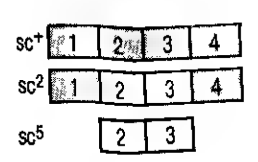
На протяжении XX столетия благодаря совершенствованию методов исследования ании представления о том, что такое ген, как он устроен и какова его функция в летке и в организме в целом, постоянно развивались.

Существование дискретных единиц наследственности, было постулировано Менделем в его работе «Опыты над растительными гибридами». Анализируя результаты скрещиваний различных линий гороха, он пришел к выводу, что отдельные ризнаки контролируются некими факторами, которые не исчезают, не сливаются, комбинируются и проявляются у потомков в определенных численных соотношениях (3:1; 9:3:3:1 и др.). В 1909 г. В. Иогансен предложил называть единицы наследственности **генами**, совокупность генов организма – **генотипом**, а их проявление **фенотипом**.

3.1.2. ГЕН – ЕДИНИЦА МУТАЦИИ, РЕКОМБИНАЦИИ И ФУНКЦИИ

К середине 20-х гг. XX века, в значительной степени благодаря работам Т. Моргана и го сотрудников, сложилось представление о гене, как единице мутации, рекомбинации и функции. В те годы генетический анализ рецессивных мутаций проводился помощью функционального и рекомбинационного тестов на аллелизм.

Функциональный тест. Функциональное сходство рецессивных аллелей одного гена определялось по проявлению мутантного фенотипа у гетерозигот. Проявление нормального фенотипа у гетерозигот считалось доказательством неаллельности рецессивных мутаций. Однако этот тест оказался недостаточно точным, потому что в отдельных, редких случаях гетерозиготы по аллелям одного гена могут иметь нормальный фенотип. Кроме того, функциональный тест не применим к доминантным аллелям, так как гетерозиготы по нормальному доминантному (+) и рецессивному



Обозначения:

sc+ – нормальные мухи

☐ – общие отсутствующие щетинки

■ – щетинки есть

Рис. 3.1. Ступенчатый аллелизм

(а) аллелю одного гена (а /+), также как и гетерозиготы по аллелям различных генов (а/+ b/+), имеют обычно нормальный фенотип. В конце 40-х годов Э. Льюис предложил более точный и информативный *цис-транс*-тест для определения аллельности мутаций (см. ниже).

Рекомбинационный тест. Согласно этому тесту мутации признавались неаллельными, если между ними происходил кроссинговер. Однако в более поздних исследованиях 40–50-х годов при увеличении разрешающей возможности генетического анализа было показано, что кроссинговер имеет место и в пределах одного гена, хотя и с низкой частотой, измеряемой в сотых и тысячных долях процента. С другой стороны, есть участки хромосом (прицентромерные и прителомерные), в которых кроссинговер между соседними генами затруднен, и поэтому его отсутствие в таких участках не является доказательством аллельности мутаций.

Разрешающие возможности применяемых методов анализа были таковы, что ген можно было определить только, как часть хромосомы, неделимую при возникновении мутаций и в процессе рекомбинации с другими генами.

Однако уже в 1929 г. появились экспериментальные доказательства делимости гена. А.С. Серебровский и Н.П. Дубинин выявили сложное строение гена *achaete scute* (редукция щетинок). Мутации отдельных участков этого сложного гена вызывают отсутствие разных щетинок. В случае перекрывания этих участков («центров», по терминологии авторов) в локусе *ac sc* у гетерозигот отсутствуют только общие щетинки. У *Drosophila melanogaster* задний отдел груди scutellum имеет 4 щетинки. Если у гомозигот sc^2/sc^2 отсутствуют щетинки 1, 2, 3, а у мутантов sc^5/sc^5 – 2, 3, 4, тогда у *компаундов*, т.е. гетерозигот по аллелям одного гена sc^2/sc^5, будут отсутствовать щетинки 2 и 3 (рис. 3.1.). Такое явление было названо **ступенчатым аллелизмом.**

На примере различных мутаций локуса *ac sc* авторами было показано, что ген не всегда мутирует как единое целое: мутации могут затрагивать различные его участки. Новаторская идея о делимости гена не сразу получила признание среди генетиков, однако множество данных, полученных на различных объектах, в конце концов убедили генетическое сообщество в том, что ген не является единицей мутации и рекомбинации.

3.1.3. ОДИН ГЕН – ОДИН ФЕРМЕНТ

В 1899 и 1901 гг. в различных журналах были опубликованы сообщения А. Гэррода о семейных случаях алкаптонурии (пигментация соединительной ткани, артрит, моча черного цвета). В 1/4 этих семей браки были заключены между двоюродными братьями и сестрами (двоюродными сибсами), что указывало на рецессивный характер

наследования данного заболевания. В 1908 г. А. Гэррод высказал предположение о том, что алкаптонурия обусловлена врожденной ошибкой метаболизма. Идея А. Гэррода о наследственной природе нарушений обмена веществ получила свое развитие в работах Дж. Бидла, Б. Эфрусси и Э. Тэйтума. В 30-е г. Дж. Бидл и Б. Эфрусси на основании своих работ на дрозофиле пришли к выводу, что мутации блокируют определенные этапы биосинтеза того или иного конечного продукта (гл. 5). В 50-е гг. Дж. Бидл и Э. Тэйтум, изучая коллекцию УФ-индуцированных мутантов нейроспоры, заключили, что неспособность каждого из этих штаммов синтезировать какую-то определенную аминокислоту связана с наследственным нарушением фермента, контролирующего данный этап биосинтеза. Так было сформулировано важнейшее положение биохимической генетики: «один ген – один фермент». Это положение означает, что один ген кодирует фермент, катализирующий одну из биохимических реакций.

3.1.4. ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ГЕНЕТИЧЕСКОЙ РОЛИ МОЛЕКУЛЫ ДНК И ОТКРЫТИЕ ЕЁ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ

К 1944 г. О. Эйвери и его коллеги К. Маклеод и М. Маккарти открыли трансформирующую активность ДНК у пневмококков. Эти авторы продолжили работу Гриффита, описавшего феномен трансформации (передачи наследственных признаков) у бактерий. О. Эйвери, К. Маклеод, М. Маккарти показали, что при удалении белков, полисахаридов и РНК трансформация бактерий не нарушается, а при воздействии на индуцирующее вещество ферментом дезоксирибонуклеазой трансформирующая активность исчезает. В этих экспериментах впервые была продемонстрирована генетическая роль молекулы ДНК (рис. 3.2). В 1952 г. А. Херши и М. Чейз подтвердили генетическую роль молекулы ДНК в опытах на бактериофаге Т2. Пометив его белок радиоактивной серой ^{35}S, а ДНК – радиоактивным фосфором ^{32}P, они инфицирова-

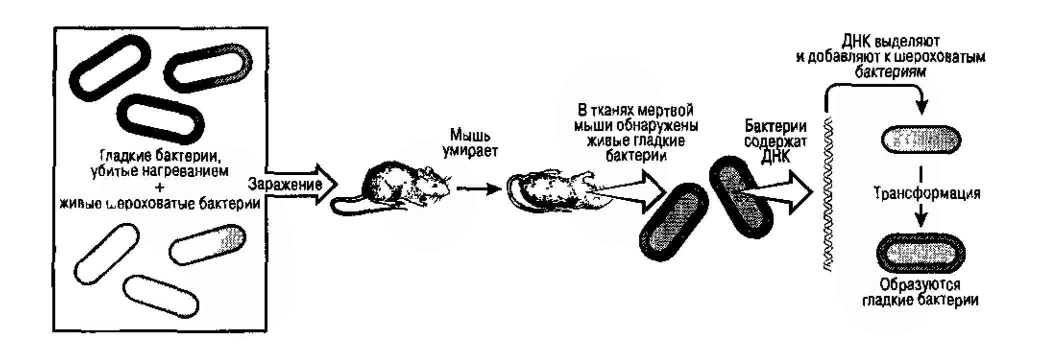


Рис. 3.2. Трансформация. (Из: Льюин, 1987)

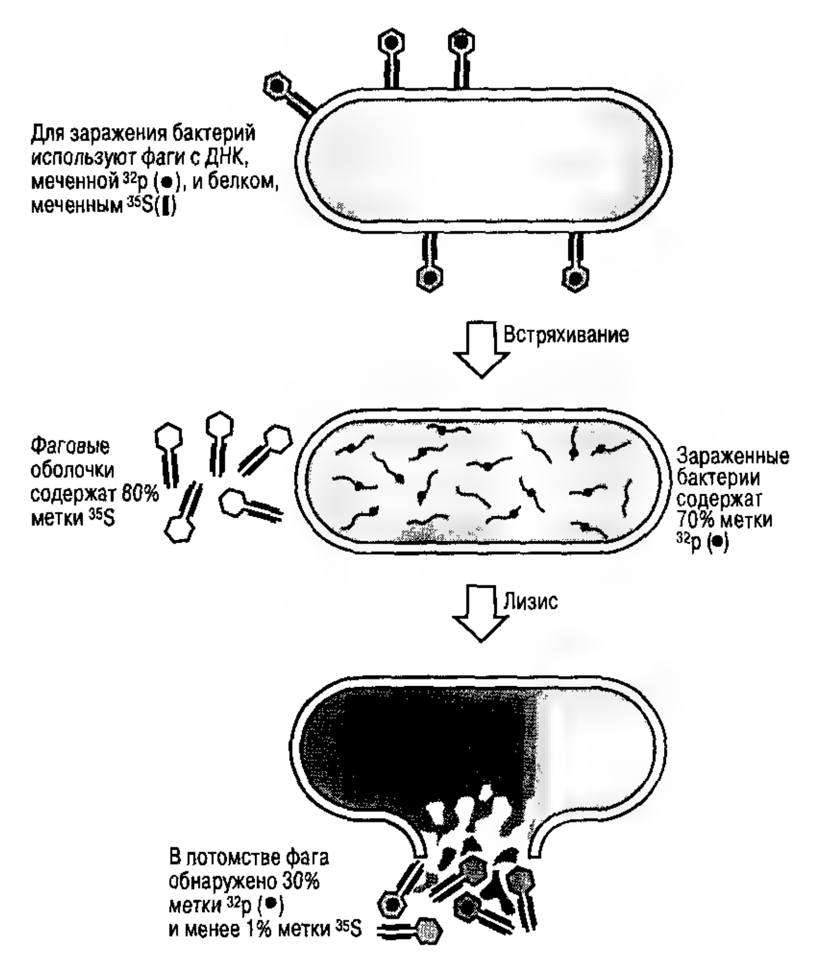


Рис. 3.3. Трансдукция. (Из: Льюин, 1987)

ли этим бактериальным вирусом кишечную палочку *E. coli*. В потомстве фага было выявлено большое количество радиоактивного фосфора и лишь следы ^{35}S. Отсюда следовало, что именно ДНК, а не белок фага проникает в бактерию, а затем после репликации передается фаговому потомству (рис. 3.3).

В 1953 г. двум американским ученым – генетику Джеймсу Уотсону и физику Френсису Крику удалось разгадать, как устроена молекула ДНК. Предложенная ими модель была основана на данных рентгено-структурного анализа ДНК, проведенного Морисом Уилкинсом и Розалинд Франклин, и учитывала правило эквивалентности Чаргаффа, согласно которому молярные отношения пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований в ДНК близки к 1:1, т.е. содержание A = T, а C = G (структура молекулы ДНК описана в разд. 3.2.). Дальнейшие исследования показали, каким образом относительно просто устроенная молекула справляется со своей гене-

тической ролью. Оказалось, что ДНК передает наследственную информацию в матричных процессах репликации и транскрипции. Наличие же всего четырех азотистых оснований, которые в различных сочетаниях организованы в триплетные кодирующие единицы – кодоны, не ограничивает возможности выполнения этой молекулой своих генетических функций, поскольку различная последовательность оснований и их соотношение (A+T)/(G+C) обеспечивают генетическое разнообразие видов и индивидуумов.

3.1.5. ОДИН ГЕН – ОДНА ПОЛИПЕПТИДНАЯ ЦЕПЬ

В 1957 г. Дж. Ингрем показал, что тяжелая анемия у человека, при которой эритроциты приобретают форму серпа (так называемая «серповидноклеточная анемия»), обусловлена изменением аминокислотного состава гемоглобина. Но поскольку гемоглобин состоит из двух α- и двух β-субъединиц, то естественно было предположить, что каждая из субъединиц имеет собственную генетическую детерминанту. В связи с тем, что белки могут состоять из различных полипептидных цепей, кодируемых разными генами, гипотеза «один ген – один фермент» получила более точную формулировку: «один ген – одна полипептидная цепь», т.е. один ген контролирует синтез одной полипептидной цепи

3.1.6. ГЕН – ЦИСТРОН

В середине XX века чрезвычайно популярным объектом генетических исследований стал бактериофаг Т4. Быстрота размножения этого бактериального вируса и огромная численность дочерних популяций позволяла анализировать редкие генетические события, например рекомбинацию мутантных аллелей в пределах одного гена (*внутригенная рекомбинация*). Анализируя большую коллекцию мутантов по области rII фага Т4, американский генетик Сеймур Бензер использовал в своей работе методы, позволявшие ему отличить мутации одного гена от мутаций различных генов и локализовать их на генетической карте. Аллельность мутаций определялась с помощью *цис-транс*-теста (метода, предложенного Эдвардом Льюисом для исследования мутаций у дрозофилы; с помощью именно этого метода Льюису удалось показать, что две мутации *Star* и *asteroid*, обусловливающие грубые, маленькие глаза у дрозофилы, являются мутациями различных генов).

Цис-транс-тест основан на сравнении фенотипов гетерозигот с *цис*- и *транс*-положениями аллелей. *Цис*-гетерозиготы (аллели локализованы в одной из гомологичных хромосом) как по аллельным, так и неаллельным мутациям имеют нормальный фенотип. У *транс*-гетерозигот по аллельным мутациям (аллели расположены в разных гомологах) фенотип мутантный, а по неаллельным мутациям – нормальный (рис. 3.4 и 3.5).

В отличие от диплоидных организмов, для которых был предложен *цис-транс*-тест, бактериофаг гаплоиден. Однако когда молекулы ДНК различных фаговых частиц проникают в бактериальную клетку, часть генов оказывается в диплоидном со-

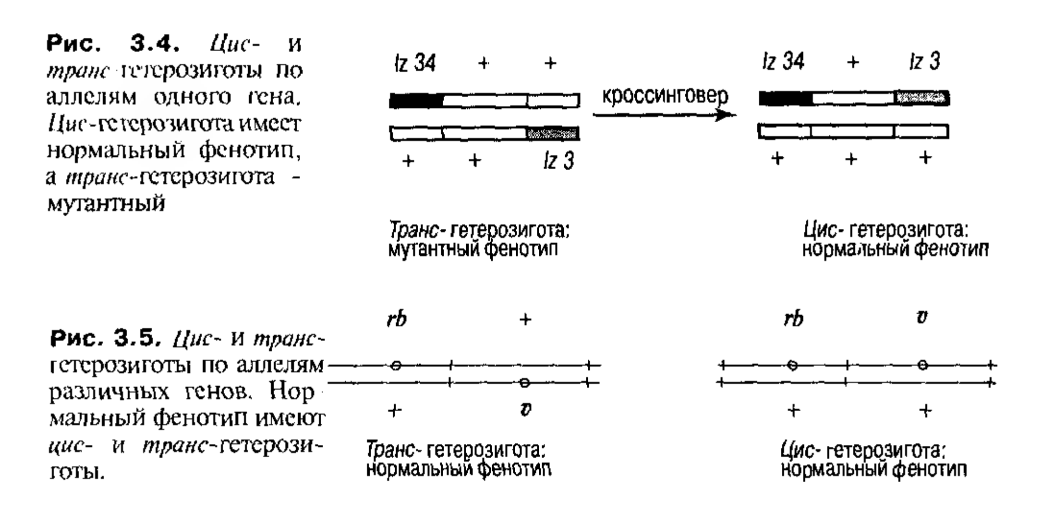


Рис. 3.4. *Цис-* и *транс*-гетерозиготы по аллелям одного гена. *Цис*-гетерозигота имеет нормальный фенотип, а *транс*-гетерозигота - мутантный

Рис. 3.5. *Цис-* и *транс*-гетерозиготы по аллелям различных генов. Нормальный фенотип имеют *цис-* и *транс*-гетерозиготы.

стоянии. Между этими генами, а также внутри них (с низкой частотой может происходить рекомбинация). Расстояние между мутантными сайтами в пределах одного гена можно определить по частоте рекомбинантов дикого типа.

С помощью *цис-транс*-теста, С. Бензер разбил область rII на два функциональных участка А и В, позднее названных **цистронами** (рис. 3.6).

Размер цистрона может быть определен в единицах рекомбинации на генетической карте и/или в нуклеотидных парах, поскольку цистрон занимает определенный участок молекулы ДНК. Длина цистрона rIIA составляет примерно в 2400 п.н., а rII B – 1200 п.н. В настоящее время термин «цистрон» употребляется крайне редко, но сути дела этот термин является синонимом термина «ген».

По мере изучения молекулярной структуры гена, а также механизмов транскрипции и трансляции стало очевидным, что представление о гене как о единице функции подлежит уточнению; более того, изменилось и наше представление о том, что есть функция гена. В домолекулярный период развития генетики под функцией гена понимали признаки, им определяемые (например, желтая и зелёная окраска семян гороха, ярко-красные (*vermilion*) и белые глаза (*white*) у дрозофилы, атаксия (*ax*) у мышей и др.). Если за функцию принимать синтез определенного белка, то в результате особенностей транскрипции эукариотических генов, или вследствие различных мутаций, такие гены, как нам теперь известно, могут детерминировать синтез белков с разными функциями. В медицинской генетике существует понятие «аллельная серия» – группа нозологически самостоятельных заболеваний, вызванных различными мутациями одного гена. Так различные мутации в гене *PMP22* 17-й хромосомы являются причиной: 1) моторно-сенсорной нейропатии 1A, 2) наследственной нейропатии с предрасположенностью к параличам от сдавления и 3) болезни Дежерина–Сотта (см. гл. 21).

Межгенная и межаллельная комплементация. Под *межгенной комплементацией* понимают способность неаллельных генов в *транс*-положении у гетерозигот детерминировать продукты, которые обусловливают проявление нормального фенотипа. Ес-

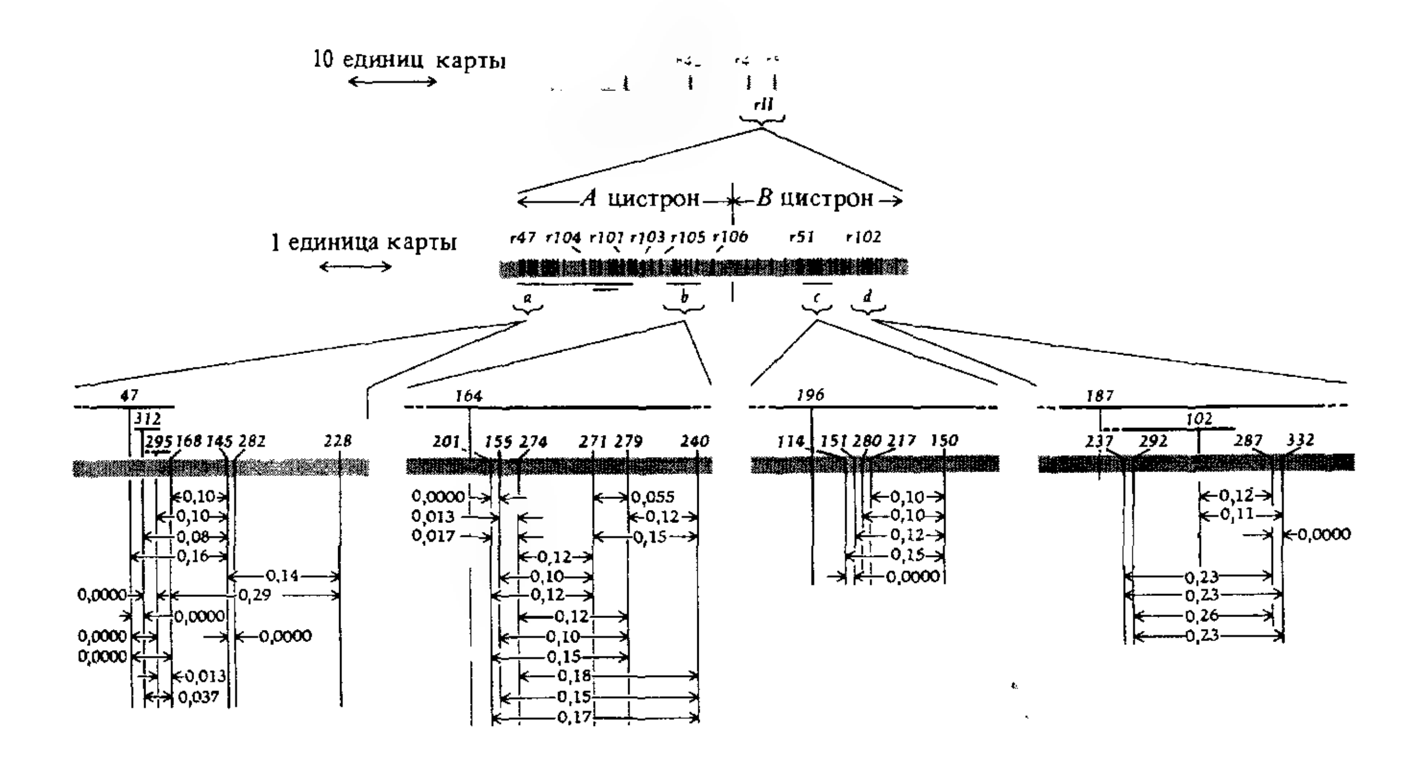


Рис. 3. 6. Генетическая карта района rII фага T4. (Из: Айала и Кайгер, 1988)

Цифры указывают расстояние в процентах рекомбинантов дикого типа, возникающих при скрещивании мутантных фагов.

ли мутации принадлежат разным генам, активность фермента в *транс-* и *цис-*положении должна быть одинакова, поскольку в обоих случаях возникает дигетерозигота по данным генам.

Если мутации затрагивают один и тот же ген, ожидается разница ферментативной активности у *цис-* и *транс-*гетерозигот. Так при *цис-*положении мутаций гетерозигота несет в одной из гомологичных хромосом аллель дикого типа, а при *транс-*положении возникает *компаунд* двух мутантных аллелей, который если и обеспечивает ферментативную активность, то меньшую, чем *цис-*гетерозигота.

Проявление нормального фенотипа у *транс-*гетерозигот по аллелям одного гена называется *межаллельной (внутригенной) комплементацией*. При межаллельной комплементации хотя и образуется активный фермент, но мутационные изменения сохраняются, они только скрыты и выявляются при экстремальных условиях. Предполагается, что причиной исправления белка при межаллельной комплементации является взаимодействие между по-разному измененными субъединицами за счет механизма конформационных взаимодействий. Активный фермент, возникающий при межаллельной комплементации, состоит из двух мономеров по одному от каждого родителя.

Псевдоаллелизм. Между мутантными сайтами (участками) одного гена может происходить кроссинговер. В 50-х годах такого типа аллели было предложено называть **псевдоаллелями** или **гетероаллелями**. Каждый мутантный сайт в гомозиготном состоянии представляет один из рецессивных аллелей гена. При скрещивании таких мутантов, можно получить *транс-*гетерозиготу по аллелям одного гена. Расстояние между различными сайтами сложного гена определяют по частоте появления *цис-*гетерозиготных, нормальных по фенотипу особей, среди потомков *транс-*гетерозиготных мутантных организмов.

Первая генетическая карта сложного гена была составлена супругами М. и К. Грин. Изучая ген *lozenge* у дрозофилы (гладкие глаза, без фасеток) с помощью *цис-транс-теста*, они показали наличие, по крайней мере, трех групп аллелей, разделяемых кроссинговером.

3.1.7. ГЕН – УЧАСТОК ДНК (ИЛИ РНК У НЕКОТОРЫХ ВИРУСОВ)

Современное представление о структуре гена, его функционировании, регуляции его активности складывалось во второй половине XX века. Важными вехами на этом пути стали:

- открытие двухспиральной структуры ДНК;
- выделение РНК и выяснение ее роли в передаче наследственной информации от ДНК к РНК и белку;
- расшифровка генетического кода.

В 1961 г. М. Ниренберг и Дж. Матеи открыли кодирующие свойства синтетических полирибонуклеотидов в бесклеточных системах трансляции. Было показано, что *UUU* кодирует фенилаланин, ААА – лизин, ССС – пролин. В 1964 г. генетический код был расшифрован полностью. Стало очевидно, что ген представляет собой определенную последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК. При этом каждые

три основания в цепи ДНК кодируют одну аминокислоту в соответствующих полипептидных цепях.

В отличие от генов, кодирующих белки, процесс считывания информации с генов рибосомной РНК (рРНК) и транспортной РНК (тРНК) заканчивается на их транскрипции. С 1966 г. методом гибридизации ДНК с радиоактивно меченной РНК изучалась локализация генов рРНК у ряда объектов. Оказалось, что локусы рибосомных генов *18S* и *28S* чаще расположены в гетерохроматиновых прицентромерной и теломерной областях хромосом. У человека рибосомные гены картируются в коротких плечах акроцентрических хромосом. Гены *5S*-рРНК, как правило, выявляются в различных хромосомах и вне ядрышкового организатора.

Во второй половине 70-х гг. появились данные о локализации генов тРНК у *E. coli*, дрожжей, *Xenopus laevis, Drosophila melanogaster.* Гены, кодирующие рибосомную и транспортную РНК были отнесены к генам «домашнего хозяйства», поскольку работают в каждой клетке и необходимы для поддержания ее жизнеспособности. Однако в отличие от генов рРНК, гены тРНК диспергированы по геному.

Бурное развитие молекулярной биологии, появление новых методов и приборов, в частности секвенаторов, сделало возможным изучение структуры генов у эукаритов.

Первыми в конце 70-х гг. были расшифрованы нуклеотидные последовательности β- и α-глобиновых генов человека. Оказалось, что эукариотические гены устроены сложнее, чем гены прокариотов. Они имеют мозаичную структуру и состоят из кодирующих участков — **экзонов** и расположенных между ними некодирующих областей – **интронов**. При транскрипции ДНК считывается целиком, а затем образовавшаяся пре-мРНК подвергается созреванию (**процессингу**): участки РНК транс-

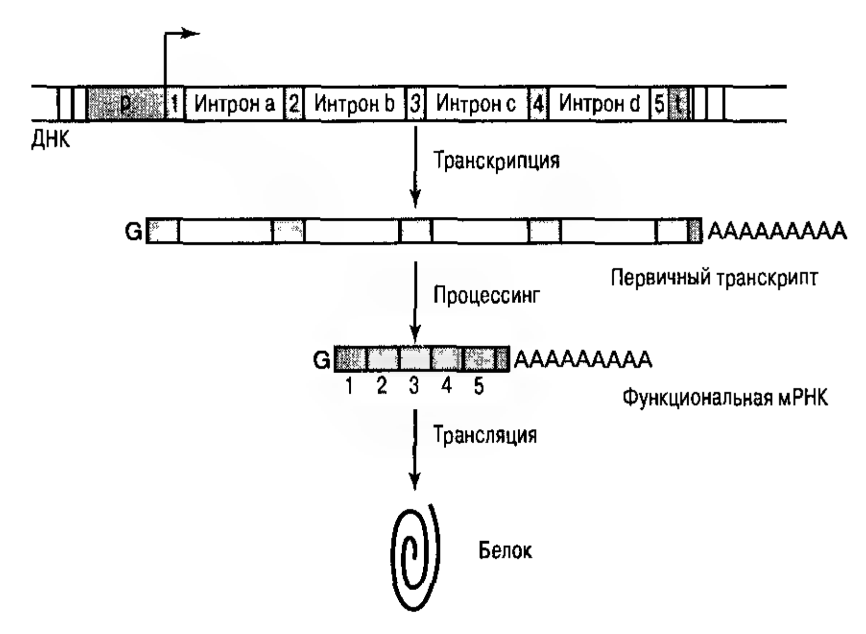


Рис. 3.7. Сплайсинг матричной РНК. (Из: Глик и Пастернак, 2002)

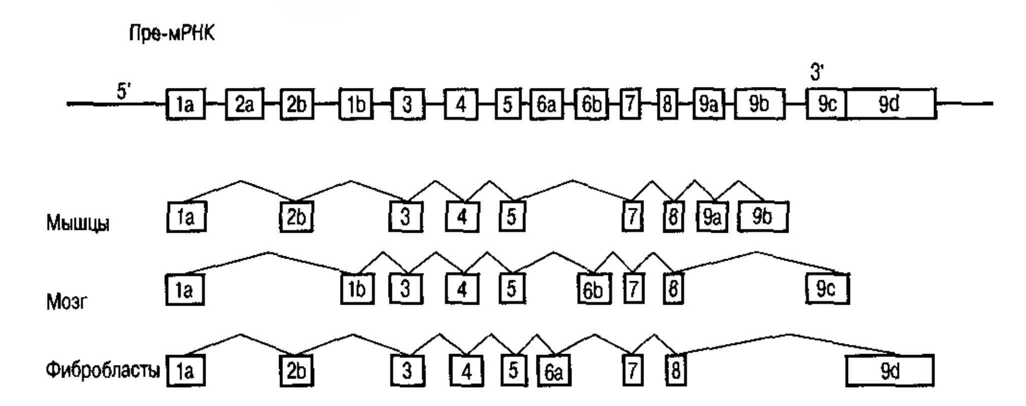


Рис. 3.8. Альтернативный сплайсинг пре-мРНК гена α-тропомиозина. (По: Griffiths et al., 2000)

крибированные с интронов, вырезаются, а участки РНК, ситезированные на экзонах, сшиваются (**сплайсинг**) (рис. 3.7). Наряду с последовательным вырезанием интронов, существует еще и *альтернативный сплайсинг*, в результате которого экзоны одного гена соединяются в разных комбинациях с образованием различных зрелых мРНК (рис. 3.8). Это явление в корне изменило представление о гене, как единице наследственности, кодирующей только одну полипептидную цепь. Вот почему в современной генетической литературе нет единого общепринятого определения термина «ген». Так, в основу одних определений положена структурная организация гена, других – функция в организме, в третьих определениях – ген рассматривается как единица в процессе транскрипции, в четвертых – к перечисленным функциям добавляется возможность транскрипции с одного гена нескольких вариантов мРНК. Мы предлагаем расширенное определение термина «ген» с учетом его структурных и функциональных особенностей.

Структурный ген – это участок ДНК или РНК (у некоторых вирусов), определяющий линейную последовательность полипептидной цепи или одной молекулы тРНК или рРНК. За счет разных рамок считывания, альтернативного сплайсинга и различных промоторов (см. гл. 12) с одного гена могут быть транскрибированы несколько мРНК, выполняющих сходные или различные функции.

3.2. СТРУКТУРА МОЛЕКУЛЫ ДНК

В 1953 г. Джеймс Уотсон и Френсис Крик, основываясь на данных рентгеноструктурного анализа кристаллов ДНК, пришли к выводу, что ее молекула состоит из двух полимерных цепей, образующих двойную спираль. ДНК – это полинуклеотид, сложенный из отдельных «кирпичиков» мононуклеотидов. В состав мононуклеотидов входят нуклеозиды, соединенные остатками фосфорной кислоты. Каждый нуклео-

Таблица 3.1. **Номенклатура азотистых оснований, нуклеозидов и мононуклеотидов молекулы ДНК (по Т.Т. Березов, 1983)**

Азотистые основания		*Дезоксинуклеозиды*	*Дезоксирибонуклеотиды*	*Сокращенное обозначение*
Пуриновые	Аденин (А)	Аденозин	Адениловая кислота (аденозин-5′-монофосфат	AMP
	Гуанин (G)	Гуанозин	Гуаниловая кислота (гуанозин-5′-монофосфат)	GMP
Пиримидиновые	Цитозин (С)	Цитидин	Цитидиловая кислота (цитидин-5′-монофосфат)	CMP
	Тимин (Т)	Тимидин	Тимидиловая кислота (тимидин-5′-монофосфат)	TMP

зид представляет собой одно из четырех азотистых оснований (аденин, тимин, гуанин, или цитозин), соединенное с остатком дезоксирибозы.

В молекуле ДНК присутствуют нуклеотиды четырех типов: дезоксиаденозинмонофосфат (dAMP), дезоксигуанозинмонофосфат (dGMP), дезокситимидинмонофосфат (dTMP), дезоксицитидинмонофосфат (dCMP). Номенклатура азотистых оснований, нуклеозидов и мононуклеотидов молекулы ДНК представлена в табл. 3.1.

ДНК имеет форму спирали, в которой основания разных цепей связаны между собой водородными связями. Цепи ДНК способны разделяться с помощью специальных ферментов и служить матрицами при синтезе дочерних молекул. Важнейшее свойство ДНК – комплементарность ее цепей. Это означает, что против аденина в одной из цепей всегда стоит тимин в другой цепи, гуанин всегда соединен с цитозином. Комплементарные пары аденин и тимин соединены двумя водородными связями, а гуанин с цитозином тремя водородными связями. По наблюдению Эрвина Чаргаффа, сделанному им в 1951 г., относительные количества комплементарных пар оснований в молекуле ДНК равны, т.е. А = Т, G – С (правило Чаргаффа). Несмотря на это равенство, между разными видами организмов наблюдается значительное различие по отношению (A + T)/(G+C). Что касается индивидуальной изменчивости, то она основана на различиях в последовательности оснований в кодирующих и особенно в некодирующих участках генома.

Помимо водородных связей между основаниями разных цепей стабильность двойной спирали ДНК обеспечивают гликозидные связи между азотистыми основаниями и остатками дезоксирибозы, а также фосфодиэфирные связи между двумя соседними остатками дезоксирибозы.

ДНК может существовать в виде нескольких форм, различающихся числом пар оснований на виток, углом вращения между соседними парами оснований, расстоянием между парами оснований и диаметром спирали. В условиях *in vivo* наиболее частой является правосторонняя В-форма, в которой одна цепь повернута вокруг другой по часовой стрелке. Имеется также и левосторонняя Z-форма (рис. 3.9).

Какие же из перечисленных выше структурных и функциональных особенностей молекулы ДНК позволяют ей хранить и передавать наследственную информации от клетки к клетке, от поколения к поколению, обеспечивать новые комбинации признаков у потомства?

а

Малая бороздка

Большая бороздка

Бороздка

В-ДНК

Z-ДНК

б

Рис. 3.9. Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). (По: Гилберт, 1995)

а – структура; б – формы

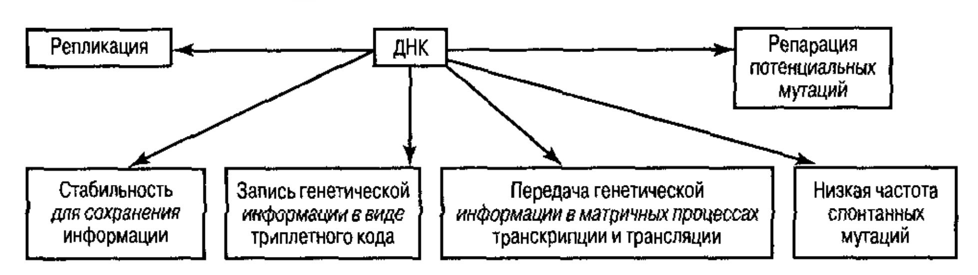


Рис. 3.10. Особенности ДНК как генетической молекулы

1. Стабильность. Она обеспечивается водородными, гликозидными и фосфодиэфирными связями, а также механизмом репарации спонтанных и индуцированных повреждений;

2. Способность к репликации. Благодаря этому механизму в соматических клетках сохраняется диплоидное число хромосом (см. гл. 2 и 9). Схематично все перечисленные особенности ДНК как генетической молекулы изображены на рис. 3.10.

3. Наличие генетического кода. Последовательность оснований в ДНК с помощью процессов транскрипции и трансляции преобразуется в последовательность аминокислот в полипептидной цепи;

4. Способность к генетической рекомбинации. Благодаря этому механизму образуются новые сочетания сцепленных генов.

3.3. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНАЯ ПЕРЕДАЧА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ В КЛЕТКЕ

Передача генетической информации в клетке основана на матричных процессах репликации, транскрипции, трансляции). Синтез дочерней цепи (*репликация*) молекулы ДНК происходит по матрице одной из двух родительских цепей с образованием новой двухцепочечной молекулы ДНК. Синтез молекулы РНК совершается в процессе *транскрипции* ДНК по матрице одной из двух цепей ДНК. Такая матричная (информационная) РНК может рассматриваться как посредник между ДНК и белком. Далее при синтезе белков генетическая информация, закодированная в последовательности триплетов азотистых оснований (кодонов), транслируется в аминокислотную последовательность полипептидных цепей. Остановимся кратко на каждом из этих процессов.

Репликация. Во время репликации происходит расхождение двух цепей ДНК, и каждая из них служит матрицей для синтеза дочерней цепи (рис. 3.11.). Такой способ репликации называется полуконсервативным. При этом дезоксирибонуклеотиды встраиваются в дочернюю цепь согласно правилу комплементарности азотистых оснований (A – T, G – C). Вновь образованная молекула состоит из одной родитель-

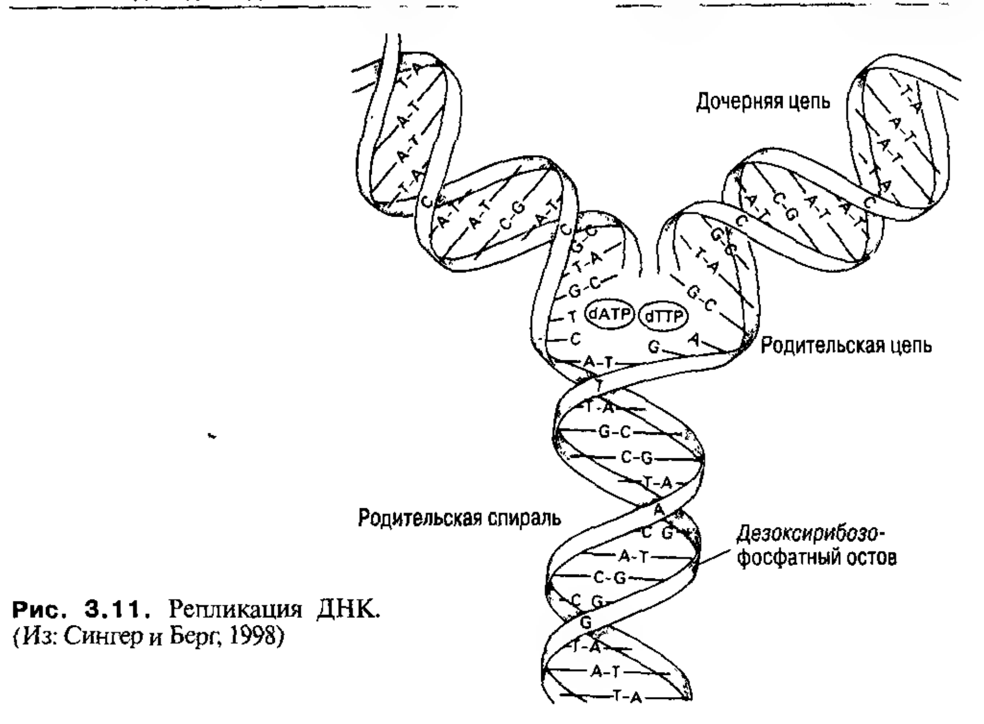


Рис. 3.11. Репликация ДНК. (Из: Сингер и Берг, 1998)

ской и одной дочерней цепи ДНК. Образование дочерних хромосом происходит на стадии синтеза (S) в интерфазе между митотическими делениями и перед первым делением мейоза (гл. 2). В анафазе удвоенные хромосомы расходятся по дочерним клеткам. Таким образом, без процесса репликации невозможно сохранение диплоидного числа хромосом в соматических клетках и образование гаплоидного набора хромосом в половых клетках после двух делений мейоза. Однако при делении клеток происходит не только сохранение числа хромосом, но и воспроизведение последовательности азотистых оснований в молекулах ДНК, основанное на комплементарности пар оснований родительской и дочерней цепей ДНК. (Более подробно механизм репликации рассматривается в гл. 9.)

Репарация. Система защиты клетки включает различные типы репарации поврежденной молекулы ДНК. Этот процесс может быть одноэтапным и многоэтапным, происходить как на свету, так и в темноте (гл. 10). Например, при эксцизионной репарации, специальный фермент делает надрез возле поврежденного участка, а затем этот участок удаляется. На месте образовавшейся бреши происходит репаративный синтез ДНК по матрице неповрежденной цепи. Ферменты репликации в редких случаях ошибочно вставляют в дочернюю цепь не комплементарное основание. Ошибки репликации исправляют специальные ферменты с корректирующей функцией; они находят и удаляют некомплементарное основание. Затем происходит замена на основание, соответствующее правилу комплементарности (А – Т, G – С).

Рекомбинация. Образование новых сочетаний генов происходит в результате обмена участками между гомологичными последовательностями ДНК (*кроссинговер*) (рис. 3.12). В процессе кроссинговера происходит обмен участками между гомоло-

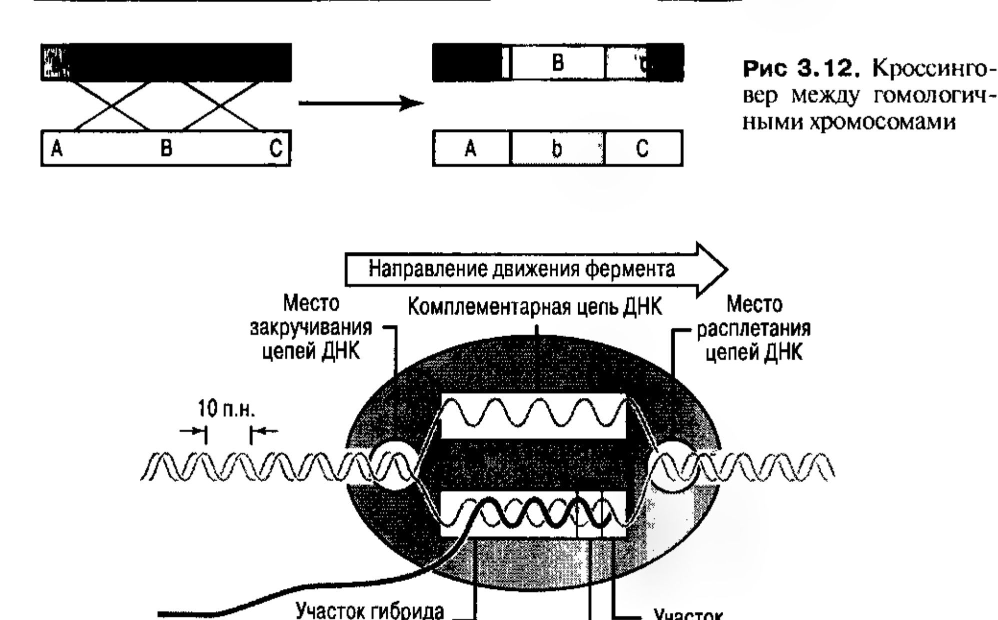


Рис 3.12. Кроссинговер между гомологичными хромосомами

ис. 3.13. Транскрипция. (Из: Сингер и Берг, 1998)

ичными хромосомами. При этом, чем дальше расположены гены, тем более часто іроисходит между ними кроссинговер. Этот принцип был использован при постро-ıнии первых генетических карт у дрозофилы и кукурузы (гл. 7).

Рекомбинация может иметь место и при незначительной гомологии нуклеотид-ных пар, например, при интеграции фагов в хромосому бактерий, и при фактичеком отсутствии этой гомологии в случае перемещения мобильных диспергированых элементов по эукариотическим хромосомам. Последние два типа событий отюсят к незаконной рекомбинации (гл. 11).

Транскрипция. Генетическая информация, записанная в последовательности осюваний в молекуле ДНК, передается на молекулу рибонуклеиновой кислоты (РНК) процессе транскрипции. РНК отличается от ДНК наличием в сахарофосфатном остове молекулы сахара рибозы вместо дезоксирибозы и другого азотистого основания – урацила (вместо тимина), комплементарного аденину. Транскрипция ДНК – атричный процесс, во время которого молекула РНК синтезируется по матрице одюй из двух цепей ДНК (рис. 3.13). При этом происходит локальное расплетение цеей ДНК в транскрибируемом участке и присоединение рибонуклеотидных остат-.ов к растущей цепи РНК. По окончании транскрипции каждого очередного участ-.а молекулы ДНК ее двухспиральная структура восстанавливается. Транскрипция аканчивается на терминаторных последовательностях гена с отделением сиинтези-

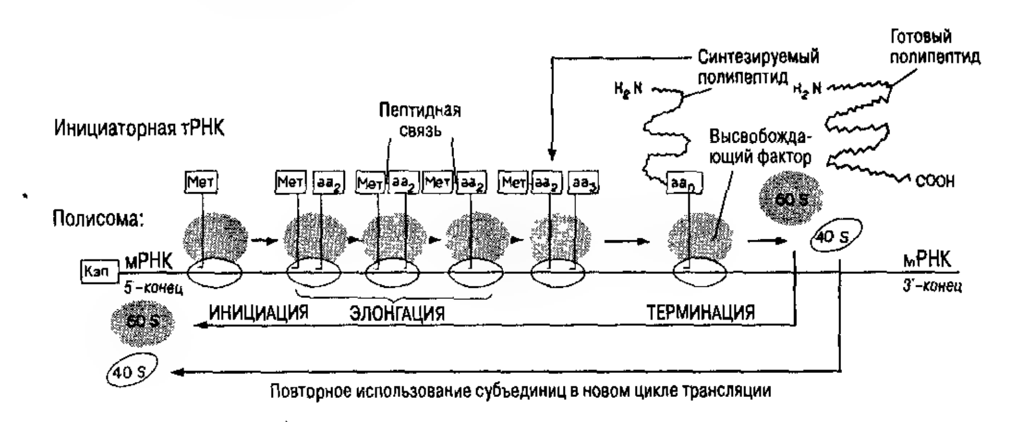


Рис. 3.14. Схема трансляции у эукариот. (Из: Гилберт, 1994)

На стадии инициации собираются субъединицы 40S и 60S (выделены серым), мРНК и инициаторная тРНК, которая находится в комплексе с аминокислотой метионином(Met) В ходе элонгации трансляции к полисоме доставляются аминокислоты, между которыми образуются пептидные связи. После образования в белке последней пептидной связи на одном из кодонов (UAG, UGA или UAA) заканчивается процесс трансляции.

рованной одноцепочечной молекулы РНК. В процессе транскрипции участвуют не только специальные ферменты, но и многочисленные регуляторные белки (гл. 12). Такие белки взаимодействуют с регуляторными последовательностями генов, обеспечивая процесс начала и окончания транскрипции и уровень нарабатываемого первичного продукта.

Трансляция. Передача генетической информации с мРНК на белок носит название трансляции. Биосинтез белка происходит на цитоплазматических структурах, называемых рибосомами. Рибосома, продвигается вдоль мРНК, последовательно выбирая из среды те аминокислоты, соединенные с транспортными РНК (тРНК), которые соответствуют кодирующим последовательностям нуклеотидов (рис. 3.14.). При этом последовательность кодонов в зрелой молекуле РНК определяет последовательность аминокислот в полипептидной цепи. Генетический код состоит из 64 кодонов. Трн из них – *нонсенс-кодоны* (на них заканчивается процесс трансляции), все остальные являются смысловыми, т.е. кодируют аминокислоты. Преобладание числа кодонов (61) над числом кодируемых ими (20) свидетельствует о вырожденности генетического кода. Это означает, что одну и ту же аминокислоту могут коднровать от 2 до 6 триплетов. Вместе с тем один кодон может кодировать только одну аминокислоту. Генетический код, записанный в хромосомах разных эукариотических организмов, универсален, несколько отличается от него только мнтохондриальный код (гл. 15).

Мутации могут возникнуть как в регуляторных, так и кодирующих участках генов. Наиболее значимы мутации в кодирующих областях, так как приводят к изменению структуры первичного продукта гена (РНК или белка). Мутационной изменчивости посвящены гл. 13 и 14.

глава

МНОГОУРОВНЕВАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА

Ірежде чем говорить об организации генома у прокариот и эукариот остановимся на жновных отличиях этих надцарств живых организмов. К прокариотам относятся ірхебактерии и бактерии, в том числе цианобактерии, или синезеленые водоросли. Эсновная особенность прокариот – отсутствие у них ядра с ядерной мембраной. Все иатричные процессы (репликация, транскрипция, трансляция) у таких организмов овершаются в одном компартменте – цитоплазме (табл. 4.1).

К эукариотам относятся как одноклеточные протисты: реснитчатые, эвгленовые, мебы, жгутиковые, солнечники, так и многоклеточные грибы, растения и живот-ные. Число хромосом у эукариот колеблется от единиц до сотен; они расположены в дре, окруженном ядерной мембраной. Эукариотические хромосомы состоят из мо-екулы ДНК, выполняющей генетическую функцию, и гистонов, на которые нама-ывается ДНК при компактизации хроматина. Матричные процессы в клетках эука-иот разобщены: репликация и транскрипция совершаются в ядре, а трансляция – в цитоплазме на рибосомах.

Генетический материал эукариотической клетки включает хромосомную (ядер-ую) ДНК, или **нуклеотип** и ДНК цитоплазматических органелл (митохондрий и лоропластов), или **цитотип**. В этой главе рассматривается молекулярная организа-ция нуклеотипа эукариот. Нехромосомной наследственности посвящена гл. 15. Ну-леотип имеет следующие уровни организации: геномный, хромосомный и генный.

4.1. ЧТО ТАКОЕ ГЕНОМ?

ермин «**геном**» впервые был введен немецким ботаником Гансом Винклером для бозначения генетического материала, составляющего гаплоидный набор хромосом растений. Гаплоидный набор хромосом обозначают как $1n$, а диплоидный – $2n$. В олекулярной генетике под термином «геном» понимают содержание ДНК в гапло-дном наборе хромосом (1С) или диплоидном наборе (2С). Общее содержание ДНК геноме (*размер генома*) принято измерять в тысячах пар нуклеотидов (т.п.н.), пико-раммах (1 пг = 10^{-9} мг) и в дальтонах.

Основная функция генома – обеспечить жизнедеятельность клеток, тканей и ор-ганов и передать информацию о наследственных свойствах организма следующему околению. Геномы прокариот и эукариот имеют некоторые сходство, но есть меж-у ними и принципиальные различия.

Таблица 4.1. **Сравнение прокариотических и эукариотических организмов (по Albertс Б. и др., 1994)**

	Прокариоты	Эукариоты
Организмы	Архебактерии Эубактерии грамположительные, цианобактерии – синезеленые водоросли, пурпурные, нефотосинтезирующие грамотрицательные	Одноклеточные эукариоты (протисты): реснитчатые, эвгленоидные, амебы, жгутиковые, солнечники. Грибы, растения и животные
Средний размер клеток	1 10 мкм	1–10 мкм
Метаболизм	Анаэробный или аэробный	Аэробный
Органеллы	Немногочисленны или отсутствуют	Ядро, митохондрии, хлоропласты, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, лизосомы, пероксисомы.
ДНК	Кольцевая ДНК в цитоплазме	Организована в хромосомы, окружена ядерной мембраной
Число хромосом	Одна	От единиц до десятков и сотен
Гистоны	Отсутствуют	H1, H2, H3, H4, H5
РНК и белки	РНК и белки синтезируются в одном компартменте	Синтез РНК в ядре, синтез белков в цитоплазме
Тип деления	Бинарный	Митоз и мейоз
Клеточная организация	Одноклеточные	Преимущественно многоклеточные
Рибосомы	70S	80S

4.1.1. ГЕНОМ БАКТЕРИЙ

Геном бактерий практически целиком состоит из генов (с их индивидуальной последовательностью оснований) и примыкающих к ним регуляторных элементов. Размеры ДНК типичного представителя прокариот – кишечной палочки *E. coli* составляет $4 \cdot 10^6$ п.н., максимальный размер генома прокариот не превышает $8 \cdot 10^6$ п.н., что намного меньше, чем у эукариот (табл. 4.2). ДНК прокариот представлена кольцевой двухцепочечной суперспирализованной молекулой, расположенной в цитоплазме в виде клубка, называемого **нуклеоидом**. Нуклеоид не отделен от цитоплазмы ядерной мембраной, в нем может содержаться несколько копий ДНК. Плотность генов в геноме прокариот значительно выше, чем в геноме эукариот. В отличие от большинства эукариотических генов гены прокариот не прерываются некодирующими областями, т.е. не имеют мозаичной экзон-интронной структуры (разд. 4.3).

Функционально связанные гены у прокариот, как правило, образуют структуры, называемые **оперонами**. Опероны – это единицы транскрипции, они имеют общие регуляторные элементы, определяющие начало транскрипции (*промоторы*) и ее окончание (*терминаторы*). Так, например, в лактозном опероне между регулятор-

Таблица 4.2. **Размер некоторых эукариотических геномов (по М. Сингер и П. Берг, 1998)**

Организм	Примерный размер гаплоидного генома в п.н.	Гаплоидное число хромосом
Дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*)	$1{,}35 \cdot 10^7$	16
Нематода (*Caenorhabditis elegans*)	$8 \cdot 10^7$	11/12
Шелкопряд (*Bombyx mori*)	$5 \cdot 10^8$	28
Плодовая мушка (*Drosophila melanogaster*)	$1{,}65 \cdot 10^8$	4
Шпорцевая лягушка (*Xenopus laevis*)	$3 \cdot 10^9$	18
Протей (*Necturus maculosus*)	$5 \cdot 10^{10}$	19
Мышь (*Mus musculus*)	$3 \cdot 10^9$	20
Человек (*Homo sapiens*)	$3 \cdot 10^9$	23
Кукуруза (*Zea mays*)	$5 \cdot 10^9$	10
Лук (*Allium cepa*)	$1{,}5 \cdot 10^{10}$	8
Арабидопсис (*Arabidopsis thaliana*)	$7 \cdot 10^7$	5

ным геном *lac I* и первым структурным геном *lac Z* расположены контролирующие элементы: промотор и оператор. Затем следуют три структурных гена *Z, Y, A*, транскрипт которых – одна полицистронная мРНК. Последовательное расположение на одном участке ДНК функционально связанных генов, видимо, способствует большей эффективности биохимических процессов, обеспечивающих синтез и утилизацию лактозы (см. гл. 12). Так ген *lac Z* кодирует фермент β-галактозидазу, ген *lac Y* – β-галактозидпермеазу и ген *lac A* – трансацетилазу. Фермент β-галактозидаза необходим для гидролиза дисахарида лактозы на галактозу и глюкозу, β-галактозидпермеаза используется для транспорта лактозы в клетку. Наконец, трансацетилаза защищает клетку от токсичных неметаболизирующихся β-галактозидов при отсутствии глюкозы и лактозы.

У эукариот функционально связанные гены не организованы в опероны, поэтому процессы активации и репрессии генов требуют участия значительно большего числа регуляторных белков и, соответственно, генов, их кодирующих. У прокариот при небольших размерах генома наличие одного регуляторного гена для нескольких структурных генов, видимо, упрощает систему регуляции их экспрессии.

Плазмиды. Наряду с основной, хромосомной, ДНК, бактерии могут иметь в своем составе внехромосомные ДНК-элементы, – плазмиды, обусловливающие различные свойства, например, устойчивость к антибиотикам, сульфаниламидам, способность синтезировать бактериоцин, гемолизин и т.д. При этом часть плазмид передается от одной бактериальной клетки к другой при конъюгации (так называемые *конъюгативные* плазмиды). Плазмиды другой группы (*неконъюгативные*) неспособны к конъюгативному переносу. Именно к конъюгативным относятся наиболее известные F- и R-плазмиды *Escherichia coli*.

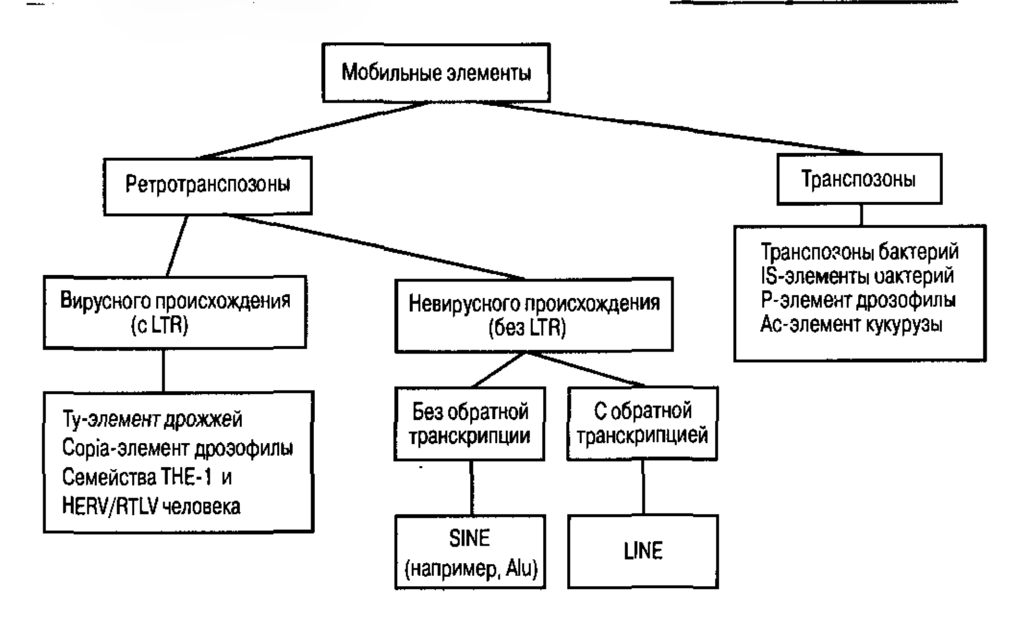


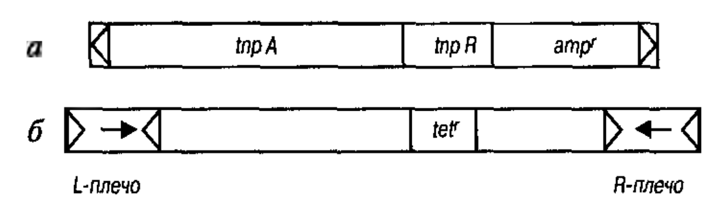
Рис. 4.1. Классификация мобильных элементов

Мигрирующие (мобильные) генетические элементы. К ним относятся ретротранспозоны и транспозоны, включающие и инсерционные последовательности бактерий (рис. 4.1).

Инсерционные последовательности (IS) – наиболее простые мобильные элементы. Частота их встраивания (10^{-5}–10^{-7}) сравнима с частотой спонтанных мутаций. Размеры IS-элементов относительно невелики – не более 1500 п.н. Они содержат ген транспозазы и фланкирующие его короткие инвертированные повторы (ITR – *inverted terminal repeats*). При перемещении IS исходный элемент остается на прежнем месте, а реплицированная копия встраивается в новый локус. Инсерции при внедрении инактивируют кодирующие и регуляторные последовательности как в локусе-мишени, так и в соседних генах. В IS-элементах есть кодоны-инициаторы, терминаторы, а также промоторные участки, которые могут влиять на экспрессию не только своих, но и рядом расположенных генов.

Простые транспозоны. Транспозоны этого типа в центральной части имеют для репликативной транспозиции: ген транспозазы (*tnp A*) и ген резольвазы (*tnp R*) (рис. 4.2, *а*). В качестве примера мобильного элемента такого типа можно привести транспозон Tn3 у *E. coli*. Длина его центральной части составляет ≈5 т.п.н., концевые повторы насчитывают всего 38 п.н.

Сложные транспозоны. Такого типа мобильные элементы, помимо генов, отвечающих за транспозицию, несут дополнительные гены (резистентности к антибиотикам, сульфамидам, тяжелым металлам) (рис. 4.2, *б*). Размер их генома варьирует в пределах от 2500 п.н. (в Tn9) до 9300 п.н. (в Tn10). На концах сложных транспозонов имеются IS-элементы с различной ориентацией: прямой – у Tn9 и обратной – у Tn10. Длина дуплицированной мишени – сегмента ДНК, в который встраиваются транспозоны, невелика: 5–12 п.н.



ис. 4.2. Структура транспозона

простой транспозон Tn 3. Tn 3 содержит около 5 т.п.н. и включает три гена: tnp A, tnp R, amp^r иноним: bla), которые кодируют ферменты транспозазу, резольвазу и лактамазу, соответстнно. *По обоим концам транспозон имеет инвертированные повторы размером 38 п.н. кажый*; б – сложный транспозон Tn10. Центральная часть Tn10, имеющая в своем составе ген усйчивости к тетрациклину tet^r, фланкирована IS-элементами: (IS10L) (левое плечо) и (IS10R) *равое плечо*). *Длинные стрелки указывают* ориентацию *плеч, каждое из которых, в свою очеэдь,* содержит инвертированные повторы

Механизм транспозиции. Согласно одной из моделей, вначале в реципиентной и онорной ДНК происходят одноцепочечные разрывы (1) и их воссоединение с обазованием коинтеграта (2) при участии транспозазы. Затем следует репликация и екомбинация, (3), в результате чего происходит обмен участками ДНК и диссоциция коинтеграта (4), катализируемые резольвазой (рис. 4.3 и 11.9).

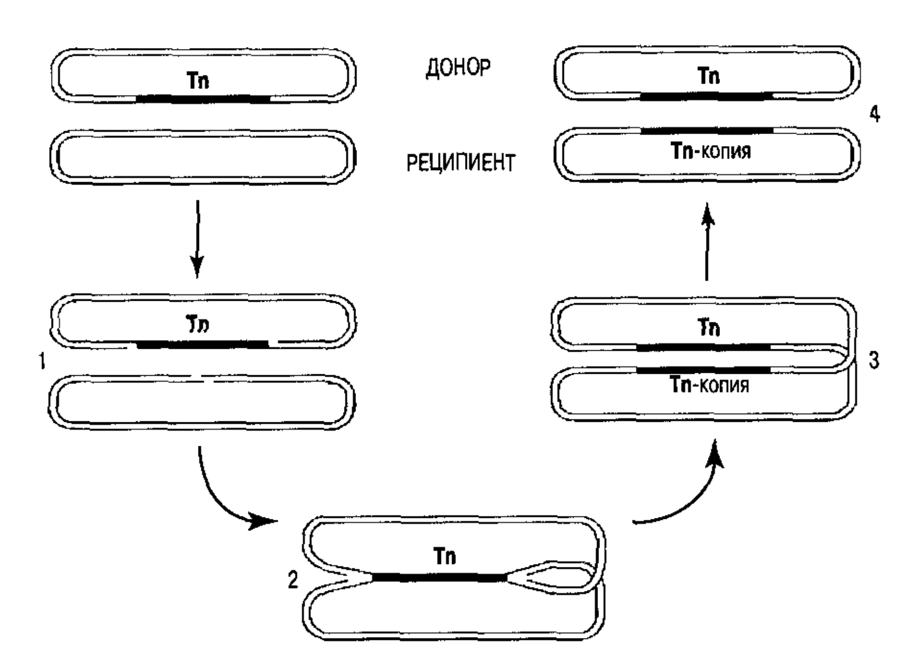


Рис. 4.3. Репликативная транспозиция. (По: Brown, 2002)

Транспозиция другого типа простое встраивание – происходит без репликации. При этом фермент производит двухцепочечные ступенчатые разрезы в хромосоме-реципиенте и в мобильном элементе, а затем концы мобильного элемента присоединяются к концам хромосомы. В этом случае по краям транспозона образуются одноцепочечные фланкирующие последовательности, по матрицам которых синтезируется ДНК для заполнения бреши. Это приводит к дупликации сайта-мишени размером от 3 до 12 нуклеотидов.

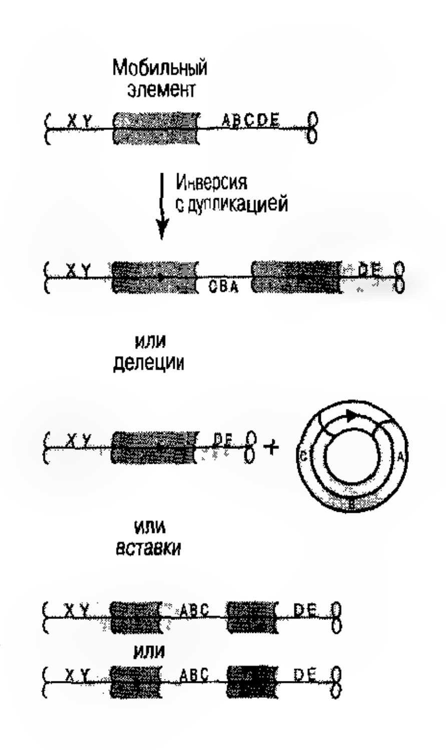


Рис. 4.4. Мобильные элементы вызывают перестройки в молекуле ДНК. (Из: Сингер и Берг, 1998)

Перемещение транспозонов по геному обеспечивается ферментом транспозазой, а их вырезание происходит в результате гомологичной рекомбинации между дуплицированными сайтами-мишенями. Транспозоны могут встраиваться в плазмиды и фаги и вместе с ними перемещаться не только между клетками внутри вида, но и между отдаленными видами бактерий.

В бактериальной клетке самостоятельно реплицируются хромосомная, фаговая и плазмидная ДНК, каждая из этих молекул представляет собой единицу репликации – репликон со своим участком инициации (ori – origin). Как оказалось, в объединении репликонов участвует транспозаза (TnpA-белок), а их разделение осуществляет резолваза – продукт гена *tnpR*. В половом факторе F и в хромосомах бактерий есть копии IS-элементов (до 6 копий IS3 и 12–IS2), которые, как считают, способствуют интеграции F-фактора в бактериальную хромосому.

Встраивание и вырезание IS- и Tn-элементов вызывают различные типы перестроек в бактериальной хромосоме – делеции, инверсии, транслокации, дупликации. Так, неточное вырезание транспозона может привести к делеции соседних последовательностей. Для образования инверсий две копии мобильного элемента должны располагаться в обратной ориентации. При конъюгации этих повторов и рекомбинации между ними может произойти переворот участка хромосомы, расположенного между мобильными элементами, на 180 градусов. При неравной рекомбинации между идентичными гомологичными элементами могут образоваться дупликации и делеции в рекомбинантных хромосомах (рис. 4.4).

4.1.2. ГЕНОМ РНК-ВИРУСОВ

У некоторых вирусов позвоночных, насекомых и растений геном представлен молекулой рибонуклеиновой кислоты. РНК-вирусы вызывают у человека различные заболевания: полиомиелит, острую респираторную инфекцию, паротит, корь, грипп, гепатит С, краснуху, гастроэнтериты и др.

Формы РНК. Геномная РНК-вирусов может быть двухцепочечной и одноцепочечной, кольцевой и линейной, сегментированной и несегментированной.

Наиболее полно РНК-вирусы изучены у птиц и млекопитающих. Их вирусная частица (*вирион*) состоит из молекулы РНК и внешней белковой оболочки (*капсида*). Однако не все вирусы имеют эту оболочку (пикорна- и реовирусы). Вирусный геном мал и кодирует белки капсида и один или несколько белков, необходимых для собственного воспроизведения. Типичную для РНК-вирусов структуру имеют одноцепочечные ретровирусы птиц. Наиболее изученные из них, лимфолейкозный (LLV) вирус и вирус саркомы Рауса (RSV), способны к размножению благодаря наличию в их геноме генов: *gag*, *pol* и *env* и длинных концевых повторов LTR. Ген *gag* кодирует капсидный белок, *pol* обратную транскриптазу, *env* – гликопротеин оболочки (рис. 4.5). Геном RSV содержит также ген *src*, обусловливающий опухолевую трансформацию клеток хозяина. Геномы ретровирусов (ASV-саркомных и ALV– лейкемических) весьма вариабельны. Многие из них утеряли гены, необходимые для самовоспроизведения, но зато имеют в своем составе гены, вызывающие опухолевую трансформацию клетков хозяина (*онкогены*) (см. гл. 24). Дефектные РНК-содержащие онкогенные вирусы в некоторых случаях лишены более 50% генома. Для их репродукции требуется вирус-помощник (helper). В результате экспрессии генома вируса-

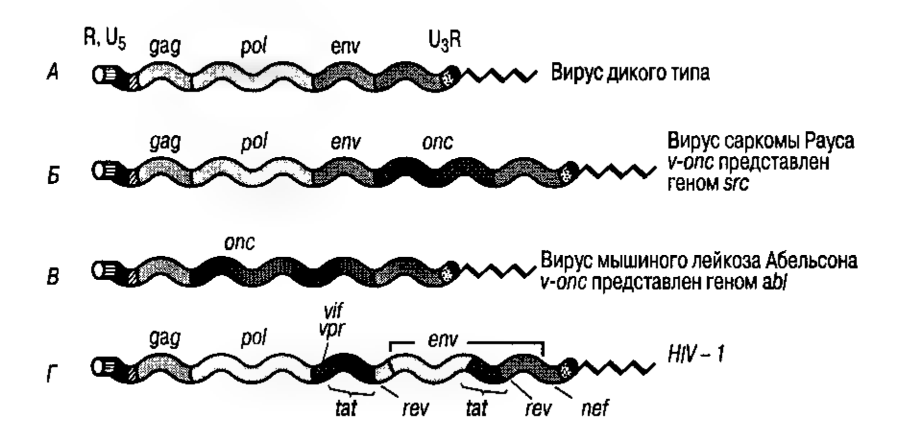


Рис. 4.5. РНК-вирусный геном. (По: Сингер и Берг, 1998)

Вирус саркомы Рауса (RSV) способен к самовоспроизведению благодаря наличию в его геноме генов: gag, pol и env, а также длинных концевых повторяющихся последовательностей LTR (long terminal repeat)

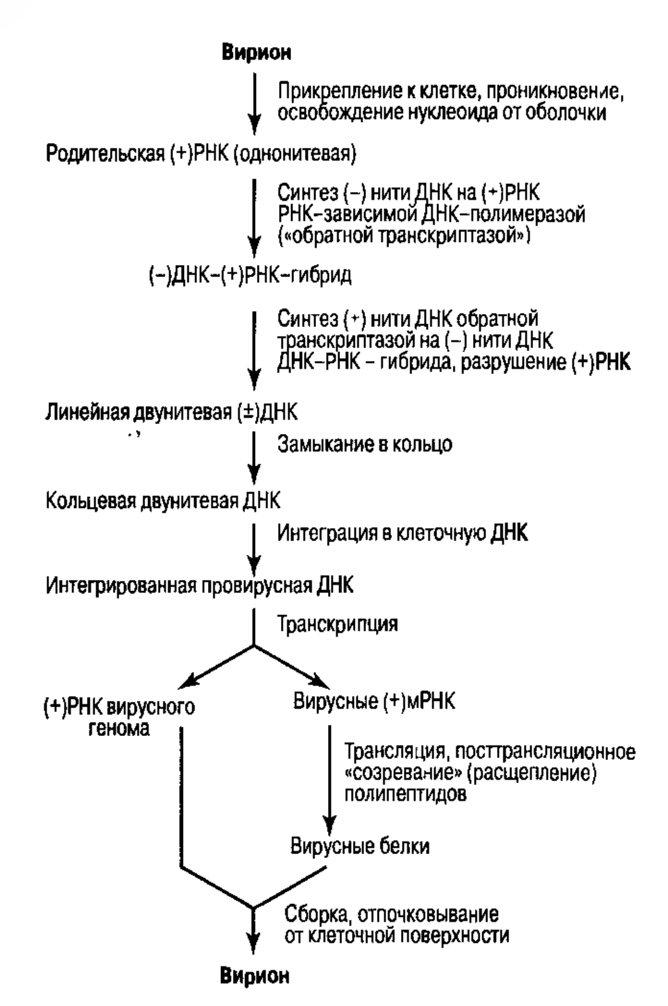


Рис. 4.6. Обратная транскрипция. (По: Хесин, 1984)

РНК-вирусы могут встроиться в молекулу ДНК хозяина только с помощью фермента, получившего название обратной транскриптазы.

помощника синтезируются белки, необходимые для сборки дефектных вирусных частиц. К таким дефектным вирусам относятся вирусы саркомы птиц PRC II, FSV, вирусы саркомы мышей, крыс, кошек, лейкозные вирусы птиц.

Обратная транскрипция. В 1946 г. была опубликована работа Л.А. Зильбера «Вирусная теория происхождения злокачественных опухолей». В 1954 г. Гросс выдвинул гипотезу, согласно которой вирусы – возбудители лейкоза передаются через половые клетки от одного поколения к другому. РНК-вирусы могут встроиться в молекулу ДНК хозяина только с помощью фермента, получившего название **обратной транскриптазы** (рис. 4.6). После проникновения вируса в клетку, обратная транскриптаза осуществляет синтез сначала одноцепочечной комплементарной ДНК, а затем по ее матрице – двухцепочечной ДНК-копии. Затем ДНК-копия вирусного РНК-генома встраивается в хромосомную ДНК клетки хозяина, вместе с ней транскрибируется, а затем транслируется с образованием вирусных белков.

4.1.3. ЭУКАРИОТИЧЕСКИЙ ГЕНОМ

Геном эукариот значительно больше по своим размерам чем геном прокариот (табл. 4.2). Так максимальный размер генома прокариот не превышает $8 \cdot 10^6$ п. н., в то время как у дрожжей он равен $1,35 \cdot 10^7$, у шелкопряда $5 \cdot 10^8$, у шпорцевой лягушки, мыши и человека – $3 \cdot 10^9$. У некоторых растений и амфибий геном достигает 10^{11} п.н. Из приведенных примеров видно, что размер генома не прямо зависит от систематического положения организма. Считается, что геномы высших организмов содержат большой избыток ДНК. Так геном млекопитающих содержит не менее $3 \cdot 10^9$ п.н., что достаточно для кодирования 3 млн. белков средних размеров. Однако по расчетам, количество белков у млекопитающих составляет несколько десятков тысяч. Геном человека насчитывает около 3,3 млрд. нуклеотидных пар (гаплоидный набор), что соответствует примерно 3,5 пикограммам ДНК, при этом на долю кодирующих областей приходится не более 3%.

Повторы. Последовательности, присутствующие в геноме в виде нескольких копий называют повторяющимися, или **повторами**, а количество копий в геноме – частотой повторяемости. Наличие повторов – отличительная особенность эукариотических геномов, которая выявляется в экспериментах по денатурации -ренатурации ДНК. Если ДНК денатурировать (разделить на фрагменты) а затем создать условия для ренатурации, или реассоциации, то скорость реассоциации будет зависеть от количества копий, или концентрации соответствующих фрагментов. Чем больше в геноме высокоповторяющихся последовательностей, тем менее сложно устроена его структура и тем быстрее идет ренатурация. В отличие от прокариот, геном которых представлен практически только уникальными последовательностями ДНК, в составе эукариот обнаруживаются фракции ДНК, которые реассоциируют значительно быстрее остальных (высокоповторяющиеся участки). Кроме того, имеются и средне-повторяющиеся фрагменты с более медленной кинетикой реассоциации, но более высокой, чем у уникальных последовательностей ДНК. Более детальный анализ позволяет выявить и слабоповторяющиеся фрагменты (последовательности, представленные в виде нескольких десятков копий).

У человека высокоповторяющаяся ДНК составляет примерно 15% всей ДНК, среднеповторяющаяся – 8% генома, слабоповторяющиеся фрагменты (десятки и сотни копий) около 4,4% генетического материала человека (эти цифры не совпадают у разных авторов и по мере дальнейших исследований могут быть изменены).

Все повторы можно подразделить на тандемно повторяющиеся, т.е. расположенные друг за другом «голова к хвосту», и диспергированные по геному. Тандемные повторы встречаются между генами и в интронах, но больше всего их в центромерных и теломерных районах хромосом. При денатурации суммарной геномной ДНК и последующей реассоциации длинные тандемные повторы составляют фракцию быстро ренатурирующей ДНК. При равновесном центрифугировании в градиенте плотности CsCl эти повторяющиеся элементы образуют зоны разной плотности (рис. 4.7). Минорный компонент ДНК, отделяющийся от основной ДНК при равновесном центрифугировании в градиенте плотности хлористого цезия, принято называть **сателлитной ДНК.** Последовательности повторяющихся единиц сателлитной ДНК (сатДНК) видоспецифичны. Так у *Drosophila melanogaster* имеются четыре ос-

новных типа сателлитных последовательностей, состоящие из 5, 7, 10 и большего числа нуклеотидов, вместе составляющих 16% геномной ДНК. ДНК *Drosophila virilis* имеет три основных сателлита, каждый из которых состоит из 7 п.н., незначительно различающихся между собой по составу азотистых оснований (табл. 4.3).

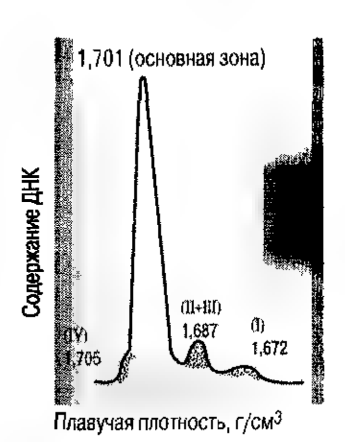


Рис. 4.7. Сателлитная ДНК. (Из: Сингер и Берг, 1998)

При равновесном центрифугировании в градиенте плотности CsCl повторяющиеся элементы образуют сателлитные зоны разной плотности

У млекопитающих, например, у грызунов, небольшую часть копий составляют идентичные последовательности, остальные отличаются множеством замен оснований, делеций и вставок. Помимо видоспецифичности и отличий повторов сателлитной ДНК по составу оснований, для некоторых вариантов тандемных повторов характерна специфичность их локализации в хромосомах. Так, декамерные повторы второго сателлита *Drosophila melanogaster* локализованы в X и Y-хромосомах, а первый сателлит встречается в X, Y и 4-й хромосомах. У дрозофилы фракция, осаждающаяся в зоне 1,679 г/см^3, включает гены рРНК. Однако гены рибосомной РНК, умеренно повторены в геноме и транскрибируются с образованием различных фракций рРНК, в то время как сателлитная ДНК состоит из высокоповторяющихся последовательностей, которые, как правило, не транскрибируются.

В хромосомах человека в центромерной области располагается α-сателлитная (альфоидная) ДНК, состоящая из следующих один за другим мономеров длиной 170–171 п.н. Существуют различные семейства этого типа ДНК. Одни из них специфичны для определенных хромосом, другие выявляются в нескольких хромосомах, третьи представлены несколькими субсемействами в одной хромосоме.

Основная часть прицентромерного района также относится к группе сателлитных ДНК. Сателлитные ДНК человека разделяются на две группы. Представители первой группы – это простые последовательности небольших размеров. Сателлиты этого типа называют «классическими», они расположены в прицентромерных районах хромосом. К ним относятся сателлиты 1, 2, 3. Сателлит 1 – это отрезок из 42 п.н., он обнаружен в метацентрических хромосомах 3 и 4, а также в акроцентриках (гл. 19 и 20). Сателлит 2 – малоконсервативный пентамерный повтор. Массивы сателлита этого типа присутствуют в хромосомах 2, 10, и 16. Сателлит 3 человека – пентамерный повтор, чередующийся с декамером. Ко второй группе относятся блоки сатДНК, состоящие из отрезков 100–200 п.н. Они встраиваются в области формирования кинетохора – в центромерном районе хромосом или вплотную прилегают к нему.

Выявлены белки, взаимодействующие с сателлитной ДНК. К таковым относятся белки типа HP1 и взаимодействующие с ними белки. Предполагается, что эти белки участвуют в регуляции активности эухроматиновых генов, особенно тех из них, которые в результате хромосомных перестроек, попали в зону влияния гетерохроматина.

Таблица 4.3. **Содержание центромерных сателлитных ДНК у *Drosophila melanogaster* и *Drosophila virilis* (по М. Сингер и П. Берг, 1998 и Б. Льюину, 1987)**

Сателлит (плавучая плотность в г/см³)	Степень повторяемости	Процент геномной ДНК	Повторяющаяся единица
Drosophila melanogaster			
I (1,672)	1,2 × 10⁶	2	5′-[AATAT] AATAT AATAT и т.д.
		1	5′-[AATATAT] AATATAT AATATAT и т.д.
II (1,686)	3,2 × 10⁵	3	5′-[AATAACATAG] AATAACATAG AATAACATAG и т.д.
III (1,688)		5	Повторяющиеся единицы длиной 254 и 359 п.н.
IV (1,705)	1,8 × 10⁵	4	5′-[AAGAG] AAGAG AAGAG и т.д.
		0,5	5′-[AAGAGAG] AAGAGAG AAGAGAG и т.д.
Drosophila virilis			
Сателлит (плавучая плотность в г/см³)	Степень повторяемости	Процент геномной ДНК	Повторяющаяся единица
I (1,692)	1,1 × 10⁷	25	5′-[ACAAACT] ACAAACT ACAAACT и т.д.
II (1,688)	3,6 × 10⁶	8	5′-[ARAAACT] ATAAACT ATAAACT и т.д.
III (1,671)	3,6 × 10⁶	8	5′-[AATATAG] AATATAG AATATAG и т.д.

Тандемно повторяющиеся последовательности размером 1–4 п.н. относят к **микросателлитным повторам**. Наиболее часто в геноме человека встречается CA-повтор. Блоки из этих повторов можно обнаружить, примерно через каждые 30 тыс. п.н. Микросателлитные повторы используются в медицинской генетике для картирования генов различных заболеваний (гл. 19).

Минисателлитные повторы характеризуются большей длиной повторяющегося элемента (более 4–5 п.н.). К минисателлитным повторам формально можно отнести и теломерные повторы, однако они, в отличие от остальных, диспергированных по геному, расположены кластером и, очевидно, играют определенную структурную роль. Обычно количество теломерных повторов составляет от 250 до 1500 – общей длиной примерно 9 т.п.н. Повторы строго одинаковые, но могут различаться для разных видов. Так, у человека основной элемент теломерных повторов представлен гексамером TTAGGG. Существует несколько семейств широко распространенных диспергированных повторов. *Короткие диспергированные повторы SINE* (от англ. *short interspersed nucleotide element*) длиной 100–500 п.н. имеют по краям короткие прямые повторы и poly(A)-последовательность на 3′-конце. Наиболее известный повтор этого типа – Alu-повтор. Его длина – 300 п.н., он состоит из двух мономеров и имеет poly(A)-хвост на 3′-конце. У человека на гаплоидный геном приходится 10^5–10^6 копий Alu-последовательностей. Эти повторы встречаются между генами, в интронах, в сателлитной ДНК и в любой ориентации относительно друг друга. Наряду с различными SINE-семействами повторов геномы млекопитающих содержат семейство *LINE-повторов* (от англ. *long interspersed nucleotide element*). LINE-повтор

представляет собой один из вариантов ретротранспозонов, в структуре которого присутствует ген обратной транскриптазы, но нет длинных концевых повторов LTR по флангам от кодирующей области. Единицы повтора у разных членов семейства имеют размер не более 6–7 т.п.н.; они отличаются по нуклеотидной последовательности. Частота копий различных членов семейства LINE-1 у человека измеряется от тысяч до сотен тысяч копий на геном.

Повторы в геноме человека встречаются не только в некодирующих, но и кодирующих участках некоторых генов. Интересны в этом плане α2 (I)-цепи коллагеновых пептидов первого типа. Этот тип коллагена находится в коже, сухожилиях, костях, строме внутренних органов. Коллаген состоит из трех α-цепей, закрученных одна вокруг другой. В основе строения α2 (I)-цепей коллагена лежит повтор из трех аминокислот: пролина, оксипролина и глицина, способствующий плотной упаковке полипептидных цепей в фибриллах. Повторам аминокислот в полипептидных цепях коллагена соответствуют повторы кодонов в экзонах гена *Col1α1*. Из этого примера видно, что не только уникальные последовательности, но, и повторы в генах могут иметь функциональное значение в кодируемых ими полипептидных цепях.

Таким образом, роль повторяющихся элементов генома может быть различной. Некоторые из них, например теломерные и альфоидные повторы, имеют структурное значение; то же время повторяющиеся гены рРНК обеспечивают более высокий уровень синтеза продукта, т.е. играют функциональную роль. Роль микросателлитных повторов, диспергированных по геному, а также Alu, LINE и многих других повторяющихся последовательностей пока остается неясной.

4.2. ХРОМОСОМНЫЙ УРОВЕНЬ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

После открытия структуры ДНК долгое время полагали, что бактериальная хромосома представляет собой чистую ДНК в виде двойной спирали. Однако позднее выяснилось, что хромосома прокариот содержит в своей структуре примерно 20% белков. Их роль – обеспечить определенную компактизацию и прикрепление ДНК к оболочке бактерии. В настоящее время белки прокариотической хромосомы известны. Показано, что мутации в соответствующих генах не приводят к заметным фенотипическим проявлениям. По-видимому, роль этих белков вспомогательная, и они могут заменять друг друга в создании определенной структуры. Таким образом, прокариоты, в отличие от эукариот, не имеют высокоспециализированной системы организации хромосомы.

Хромосома эукариот состоит в основном из белков (50–60%) и ДНК, с незначительным количеством молекул РНК (до 10% от количества ДНК). Белки можно подразделить на гистоновые (половина или большая доля белков хромосомы) и негистоновые. В свою очередь гистоновые белки, доля которых в структуре хромосомы составляет до 80%, делятся на 5 основных классов: Н3, Н4, Н2А и Н2В и Н1. Негисто-

новые белки (по большей части кислые, в отличие от гистонов) представлены большим количеством различных видов. Показано, что все они участвуют в образовании структур надмолекулярного уровня.

4.2.1. УРОВНИ УПАКОВКИ ХРОМАТИНА

Хромосомная ДНК эукариотической клетки упакована исключительно компактно. Например, самая маленькая хромосома человека 22, содержит примерно $4.6\cdot10^7$ п.н., что соответствует длине 1,4 см. Во время митоза эта хромосома укорачивается до 2 мкм, т.е. становится в 7000 раз компактнее. Очевидно, чтобы достичь такой плотности упаковки и сохранить эффективность основных генетических процессов (как правило, связанных с локальной распаковкой), структура хромосомы должна иметь несколько уровней организации. Вещество хромосомы – хроматин. В этом термине подчеркивается способность вещества хромосомы к окрашиванию, видимое уже на стадии интерфазы. Химическая структура хроматина различается по длине хромосомы, а сам хроматин претерпевает различные уровни своей упаковки от интерфазы до метафазы клеточных делений. Существуют две наиболее известные модели, объясняющие механизм упаковки хроматина. Согласно одной из них, наиболее известной в зарубежной литературе, нить ДНК претерпевает пять уровней компактизации от 2 нм (ее собственный диаметр) до 1400 нм (высококонденсированная метафазная хромосома). Низшим уровнем иерархической организации хро-

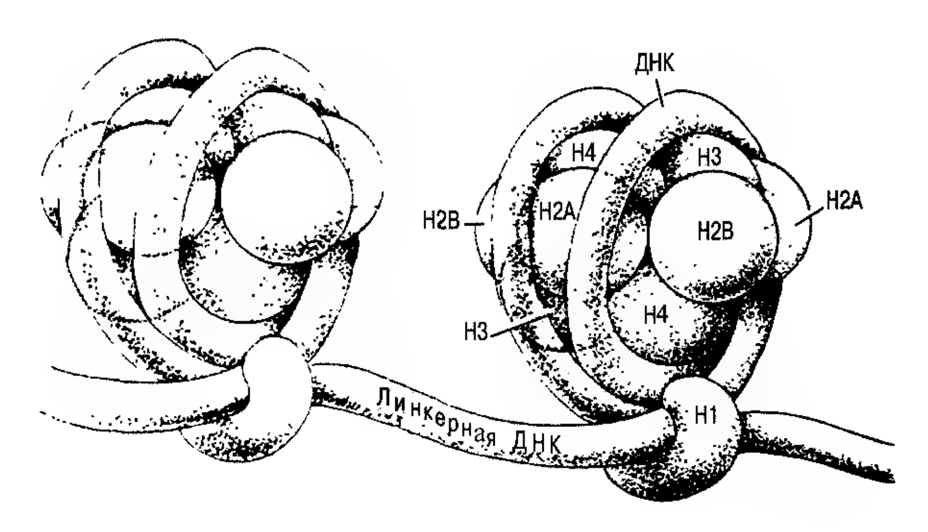


Рис. 4.8. Структура нуклеосомы. (По: Гилберт, 1995)

Нуклеосомы образуют нуклеосомную фибриллу диаметром 11 нм. 146 пар оснований ДНК накручены на октамер гистонов. Каждый из четырех гистонов (H2A, H2B, H3 и H4) повторен дважды

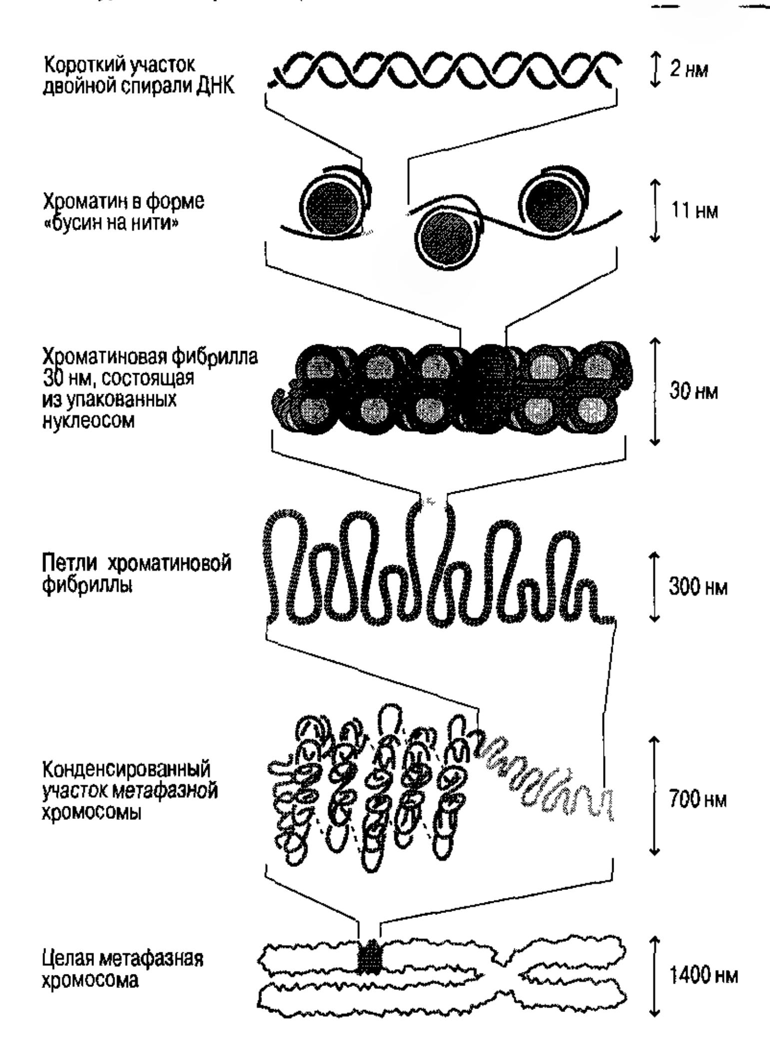


Рис. 4.9. Уровни компактизации хроматина, следующие после образования нуклеосом. (По: Албертс, Брей, Льюис, 1994)

Хроматиновая нить (30 нм), петли ДНП (300 нм), хроматида (600-700 нм) и метафазная хромосома (1400 нм)

мосом считается *нуклеосомный*. Нуклеосома состоит из кора (сердцевины, стержня) и намотанной на него ДНК (146 п.н., 1,8 витка). Кор представляет собой гистоновый октамер Н2А, Н2В, Н3, Н4 (по две молекулы каждого). Хроматин на этой стадии имеет вид «бусин» (глобул диаметром 11 нм), нанизанных на «нить» (молекулярную ДНК). Такая структура обеспечивает компактизацию примерно в 6–7 раз (рис. 4.8).

Вторая ступень компактизации – формирование *хроматиновой фибриллы диаметром 30 нм* В этом процессе участвует гистон Н1, который связывается с ДНК между нуклеосомными корами и сворачивает нуклеосомную фибриллу в спираль, наподо-

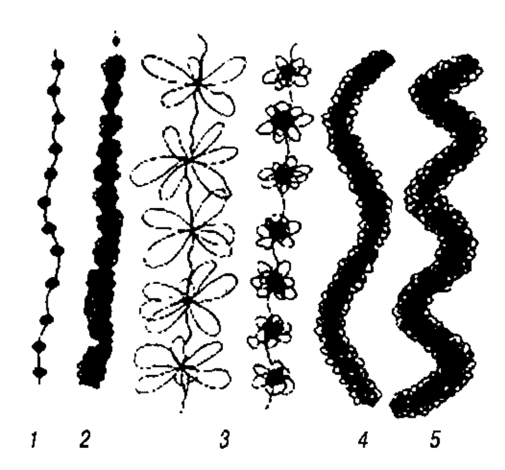


Рис. 4.10. Уровни упаковки хроматина. (По: Ченцову, 1996)

бие соленоида, с шагом в 6–8 нуклеосом. Уровень компактизации на этом этапе достигает примерно 40.

Третий этап – *петельно-доменный* – наиболее сложный. Соленоидная фибрилла складывается, образуя петли различной длины. Общий уровень компактизации возрастает до 1000, но, очевидно, может различаться в различных районах хромосомы. Диаметр такой структуры в среднем составляет 300 нм., по-видимому, она наиболее типична для интерфазной хромосомы.

На четвертом этапе компактизации 300 нм-фибриллы дополнительно сворачиваются, образуя хроматиды диаметром примерно 600–700 нм (рис. 4.9).

Последняя, пятая, ступень компактизации (в 7000 раз) характерна для метафазной хромосомы; ее диаметр равен 1400 нм.

Известна и другая схема компактизации хроматина, предложенная Ю.С. Ченцовым. Она основана на данных световой и электронной микроскопии. Согласно этой модели первым уровнем также является *нуклеосомный*. На втором этапе 8–10 нуклеосом образуют глобулу, называемую *нуклеомером*. Ряд сближенных нуклеомеров формируют 20–30-нанометровую фибриллу. Третий уровень – *хромомерный*. Петли фибрилл ДНП, скрепленные негистоновыми белками, образуют розетковидные структуры. На четвертом – *хромонемном* уровне происходит их сближение с образованием структур, состоящих из петлевых доменов. Предполагается, что на следующем, пятом, уровне компактизации, характерном для хроматид, происходит спиральная укладка хромонемных нитей (рис. 4.10).

4.2.2. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМОСОМ

Несмотря на большие успехи в изучении тонкой структуры хроматина, полной ясности в том, как устроена хромосома у эукариот, нет. На основании данных, полученных молекулярными методами, предложена модель петельно-доменной организации интерфазных хромосом. Согласно этой модели хромосома состоит из петель основания которых «заякорены» на ядерном матриксе. Такая петля может содержать один или несколько генов. При инактивации генов соответствующий петельный домен компактизуется в суперсоленоид, а при активации происходит так называемое «выпетливание». Для обозначения нуклеотидных последовательностей, связанных с ядерным матриксом, принята аббревиатура MAR (от англ. *matrix associated regions)*; участки, связанные с интерфазным/хромосомным матриксом (скэффолдом) назы-

вают SAR (от англ. *scaffold attachment regions*). Предполагается, что прикрепление петли к скэффолду поддерживает «открытую» конфигурацию хромосомного домена. Было высказано предположение о том, что MARs/SARs-последовательности являются границами структурно-функциональных единиц эукариотических хромосом. Однако имеющиеся примеры обнаружения MARs/SARs не только по флангам гена, но и в интронах противоречат этой гипотезе и свидетельствуют о необходимости дальнейшей экспериментальной проверки.

Предложена модель топологической организации рДНК и связанных с ней белков транскрипционного комплекса в структуре ядрышкового организатора (ЯОР), согласно которой активные копии рДНК локализованы в больших петлях. Эти петли прикреплены к хромосомному скэффолду, а снаружи как бы покрыты «шапкой» из белков транскрипционного комплекса. Плотно упакованные петли состоят из неактивных копий рДНК. Согласно одной из гипотез, мультикопийный комплекс рибосомных генов у животных состоит из генов четырех типов: активно-транскрибируемых, потенциально активных (не транскрибируемых в данном типе клеток), неактивных и молчащих. Прочную связь с ядерным матриксом имеют активные и потенциально-активные повторы; непрочную, разрушаемую протеазным гидролизом, – неактивные копии. В интерфазном ядре неактивные копии обнаруживаются в фибриллярном центре ЯОР, а молчащие – вне ядрышка. Неактивные копии слабо метилированы и в основном в области 18S-цистрона, в то время как «молчащие» копии интенсивно метилированы по всей длине транскрибируемых областей генов. Метилирование ДНК является одним из механизмов инактивации различных генов, в том числе и рибосомных (подробнее см. гл. 12). Показано, что неактивные копии рДНК обладают нуклеосомной организацией, тогда как активные – лишены нуклеосом.

4.2.3. ЭУХРОМАТИН И ГЕТЕРОХРОМАТИН

Эукариотическая хромосома состоит из эухроматина и гетерохроматина. Этот термин известен с 1930-х годов, когда Э. Хайц открыл окрашивающиеся гранулы в интерфазных ядрах, сохраняющие свое компактное состояние на протяжении всего клеточного цикла. Эти структуры были названы **гетерохроматином**.

По расположению в хромосоме и по тому времени, в котором эта часть хроматина находится в компактном состоянии, различают гетерохроматин двух типов: *конститутивный* и *факультативный*. Факультативный гетерохроматин представлен, например, одной из двух Х-хромосом человека, отцовским набором хромосом у кокцид (семейство божьих коровок). Одна из двух Х-хромосом человека, плотно упакованная, находится при ядерной мембране в виде телец Барра на стадии интерфазы. Конститутивный гетерохроматин локализован в прицентромерных и теломерных участках хромосом. Химическая структура его известна. Он состоит из различных фракций как умеренных, так и многократно повторяющихся последовательностей (о повторах см. разд. 4.1.3).

Функции гетерохроматина пока еще недостаточно изучены. Возможно, он играет структурную роль, поскольку расположен рядом с центромерой. Очевидно, что

ромосомные перестройки, как правило, затрагивают именно гетерохроматин. Вот почему локализация в гетерохроматиновых участках структурных генов с уникальными последовательностями могла бы привести к увеличению частоты мутаций. Изменение же структуры отдельных рибосомных генов в гетерохроматиновых районах не столь катастрофично из-за умеренного повторения этих генов в геноме. С другой стороны, кроссинговер в гетерохроматиновых районах затруднен, что снижает вероятность неравного кроссинговера, а, следовательно, образование дупликаций и делеций по рибосомным генам (о неравном кроссинговере см. в гл. 7). Наличие внутривидового и межвидового полиморфизма по блокам сателлитной ДНК в районе центромеры свидетельствует о том, что эти изменения не столь важны для ее функционирования.

В 70-ые годы было высказано предположение, что отличительные свойства гетерохроматина обусловлены спецификой его белковых компонентов, поскольку были найдены гены, мутации которых подавляют или усиливают инактивацию эухроматиновых генов, попавших в зону гетерохроматина. Как показали дальнейшие исследования, большое значение имеют различные варианты пострансляционной модификации гистонов, такие как *гипоацетилирование* и *метилирование* (см. гл. 12). В процессе гетерохроматизации участвуют также негистоновые белки типа HP1.

Эухроматин обладает следующими отличительными признаками, которые не свойственны гетерохроматину:

- на препаратах имеет более светлую окраску нежели гетерохроматин;
- состоит, в основном, из генов с индивидуальной последовательностью оснований;
- реплицируется раньше гетерохроматиновых районов;
- реже участвует в хромосомных перестройках нежели гетерохроматин;
- в отличие от конститутивного гетерохроматина не обладает свойствами соматической коньюгации.

4.2.4. СТРУКТУРА ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ И ХРОМОСОМ ТИПА «ЛАМПОВЫХ ЩЕТОК»

Гигантские политенные хромосомы у различных видов рода *Drosophila* и *Chironomus* образуются в результате многократной репликации хромосом, при которой они не расходятся, а остаются объединенными силами соматической конъюгации. Такой тип репликации называется **эндоредупликацией.**

Участки более плотно упакованного хроматина образуют структуры, названные *дисками*, а между ними находятся участки с деконденсированным хроматином — *междиски* (рис. 4.11). Каждый диск в зависимости от его размера представлен различным числом хромомер. Хромомеры – структуры, имеющие вид темно окрашенных узелков, хорошо видны в мейотических хромосомах на стадии профазы, а также на стадии интерфазы в политенных хромосомах соматических клеток. Согласно цитологическим данным диски политенных хромосом, особенно крупные, представляют собой скопления нескольких хромомер.

Уровень политении достигает у дрозофилы 512–1024 нитей ДНП (2^9 -2^{10}), что соответствует 9–10 циклам репликации, а у хирономуса этот показатель еще выше – 2048–8192 нитей (11–13 циклов). Длина политенных хромосом достигает 220–485 мкм, тогда как длина метафазных хромосом дрозофилы равна 1,5–3,2 мкм.

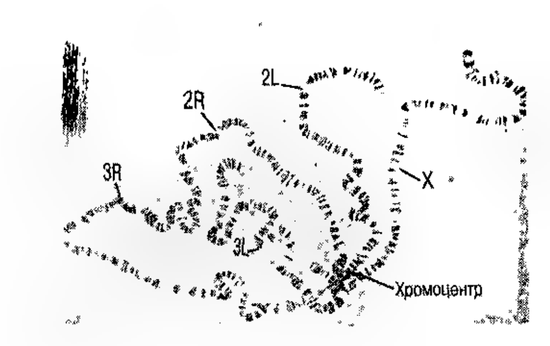


Рис. 4.11. Политенные хромосомы

В ядрах клеток с политенными хромосомами у дрозофилы имеется структура, называемая **хромоцентром**, в котором объединены прицентромерные гетерохроматиновые районы всех хромосом силами соматической конъюгации. Y-хромосома также расположена в хромоцентре, так как она в основном состоит из гетерохроматина и не имеет политенной структуры.

Рис. 4.12. Транскрипция генов в политенных хромосомах с образованием пуфов. (По: Б. Албертс, и др., 1994)

Для гетерохроматина характерны: поздняя репликация, недорепликация прицентромерных районов, а также высокая вероятность разрывов при действии различных мутагенных факторов.

Политенные хромосомы представляют интерес не только с точки зрения их организации, но и способа их функционирования. При транскрипции генов происходит деконденсация хроматина и, как следствие, образование структур, называемых **пуфами** (рис. 4.12). На разных стадиях онтогенеза в дисках начинают функционировать специфические для данной стадии гены: хроматин дисков, в которых эти гены локализованы, начинает «расплетаться», что делает возможным их транскрипцию.

Деконденсация хроматина в процессе транскрипции характерна, также для мейотических хромосом типа «ламповых щеток» (рис. 4.13). Эти хромосомы обнаружены в ооцитах рыб, земноводных, рептилий и птиц на стадии диплотены. Каждая из двух хромосом бивалента состоит из двух хроматид, поэтому при их конъюгации образуются протяженные четырехроматидные структуры. В центре каждой хромати-

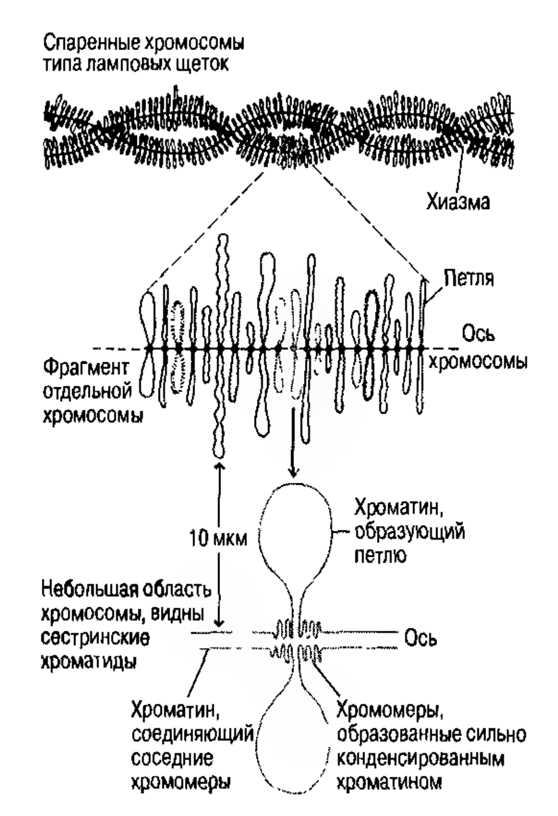


Рис. 4.13. Хромосомы типа «ламповых щеток». (По: Албертс, Брей, Льюис, 1994)

ды находится скэффолд, от которого отходят петли хроматина различного размера. Петля среднего размера содержит 50–100 т.п.н., и каждая из них соответствует определенной последовательности ДНК. Структуры типа «ламповых щеток» образуются, например, при транскрипции генов рибосомной РНК в ооцитах *Xenopus*. Специфика хромосом типа «ламповых щеток» заключается в том, что они транскрибируются более активно, чем обычные хромосомы. Это связано с необходимостью накопления значительных количеств генных продуктов в ооцитах.

4.3. ГЕННЫЙ УРОВЕНЬ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Основная единица генетической информации - ген, представляющий собой отрезок ДНК, который кодирует РНК или полипептидную цепь. Белки, состоящие из одной или нескольких полипептидных цепей, могут играть структурную или регуляторную роль, служить рецепторами для других молекул, выполнять транспортную функцию, катализировать определенную метаболическую реакцию (если белок-фермент) или как-то иначе участвовать в жизнедеятельности клетки или организма.

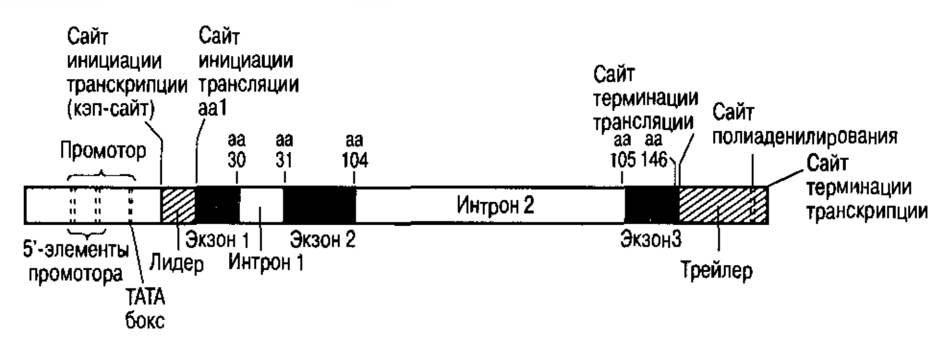


Рис. 4.14 .Структура β-глобинового гена. (По: Гилберт, 1994)

Общая черта строения про- и эукариотических генов наличие кодирующей области и, расположенных по ее флангам, регуляторных последовательностей. Кодирующие области большинства эукариотических генов имеют экзон-интронную структуру. Исключение составляют, например, гены гистонов и α и β-интерферонов, которые не имеют интронов. Экзоны кодирующие последовательности – чередуются с некодирующими последовательностями - интронами (рис. 4.14). Размеры и число экзонов и интронов индивидуальны для каждой мРНК. Как правило, интроны по размерам значительно превышают экзоны (табл. 4.4). Ранее считалось, что интроны – варианты некодирующей, «эгоистичной» ДНК. Однако открытие альтернативного сплайсинга, в процессе которого с одного гена транскрибируется несколько вариантов мРНК, за счет различных комбинаций экзонов и интронов, изменило наше представление о функции интронов. Оказалось, что в некоторых случаях интроны могут функционировать как экзоны, а экзоны – как интроны. Установлено, что в интронах могут находиться промоторы – участки, с которых начинается транскрипция. Неожиданно выяснилось, что в одном из интронов гена фактора VIII расположен другой («гены в генах»). Таким образом, по мере изучения функций «некодирующей» ДНК «ее эгоистичность» часто оказывается мнимой.

Экзоны или их сочетания могут кодировать аминокислотные последовательности, являющиеся структурными и функциональными доменами белка. Каждый эукариотический ген имеет с обеих сторон от кодирующей области основные регуляторные последовательности, выполняющие функции инициации и терминации транскрипции. Однако регуляторные участки, повышающие и понижающие уровень транскрипции (**энхансеры и сайленсеры**), могут быть расположены как внутри гена, так и на значительном расстоянии от него.

Некоторые эукариотические гены организованы в кластеры, но у них отсутствуют общие регуляторные участки, как в оперонах прокариот. К ним относятся, например, гены α- и β-цепей гемоглобина HbA. Однако во многих случаях родственные гены расположены в разных хромосомах, например, ген лактатдегидрогеназы *LDH A* – на хромосоме 11, а ген *LDH B* – на хромосоме 12.

Наряду с функциональными генами у эукариот есть **псевдогены**, которые, как правило, не транскрибируются из-за мутаций в регуляторных областях или вследствие изменений в их кодирующей области. При этом белок, если и образуется, явля-

Таблица 4.4. **Сравнительные размеры экзонов и интронов (по М. Сингер и П. Берг, 1998)**

ПРОДУКТ ГЕНА	ОРГАНИЗМ	ЭКЗОНЫ – суммарная длина (п.н.)	ИНТРОНЫ	
			Число	Суммарная длина (п.н.)
Аденозиндезаминаза	Человек	1 500	11	30 000
Аполипопротеин В	Человек	14 000	28	29 000
β-Глобин	Мышь	432	2	762
Цитохром *b*	Дрожжи (митохондрии)	2 200	6	5 100
Дигидрофолатредуктаза	Мышь	568	5	31 500
Эритропоэтин	Человек	582	4	1 562
Фактор VIII	Человек	9 000	25	177 000
Фиброин (шелк)	Шелкопряд	18 000	1	970
Гипоксантин-фосфорибозилтрансфераза	Мышь	1 307	8	32 000
α-Интерферон	Человек	600	0	0
Рецептор липопопротеина низкой плотности	Человек	5 100	17	40 000
Фазеолин	Фасоль	1 263	5	515
Тиреоглобулин	Человек	8 500	>40	100 000
тРНК[tyr]	Дрожжи	76	1	14
Субъединица уриказы	Соя	300	7	4 500
Вителлогенин	Шпорцевая лягушка	6 300	33	20 000
Зеин	Кукуруза	700	0	0

ется дефектным, не функциональным. Один из вариантов псевдогенов – так называемые процессированные псевдогены, в которых отсутствуют интроны. Последнее обстоятельство еще раз подчеркивает значение интронов для образования пре-мРНК и синтеза нормально функционирующего белка.

Наличие нескольких промоторов в одном гене обусловливает альтернативную транскрипцию, т.е. образование различных изоформ мРНК. Так в гене миодистрофии Дюшенна имеется 8 промоторов, с которых происходит альтернативная транскрипция в разных тканях (сердечных и скелетных мышцах, эмбриональных нейронах, коре мозга, сетчатке глаз), что приводит к образованию в этих тканях различных изоформ дистрофина (см. гл. 21).

Помимо альтернативной транскрипции существует и альтернативный сплайсинг. Так ген кальцитонина млекопитающих кодирует две изоформы мРНК; одна отвечает за кальцитонин щитовидной железы и состоит из первых четырех экзонов из 6. Во второй мРНК, кодирующей белок, родственный CGRP мозга, отсутствует экзон 4 (рис. 4.15). Альтернативный сплайсинг с пре-мРНК гена α-тропомиозина, в резуль-

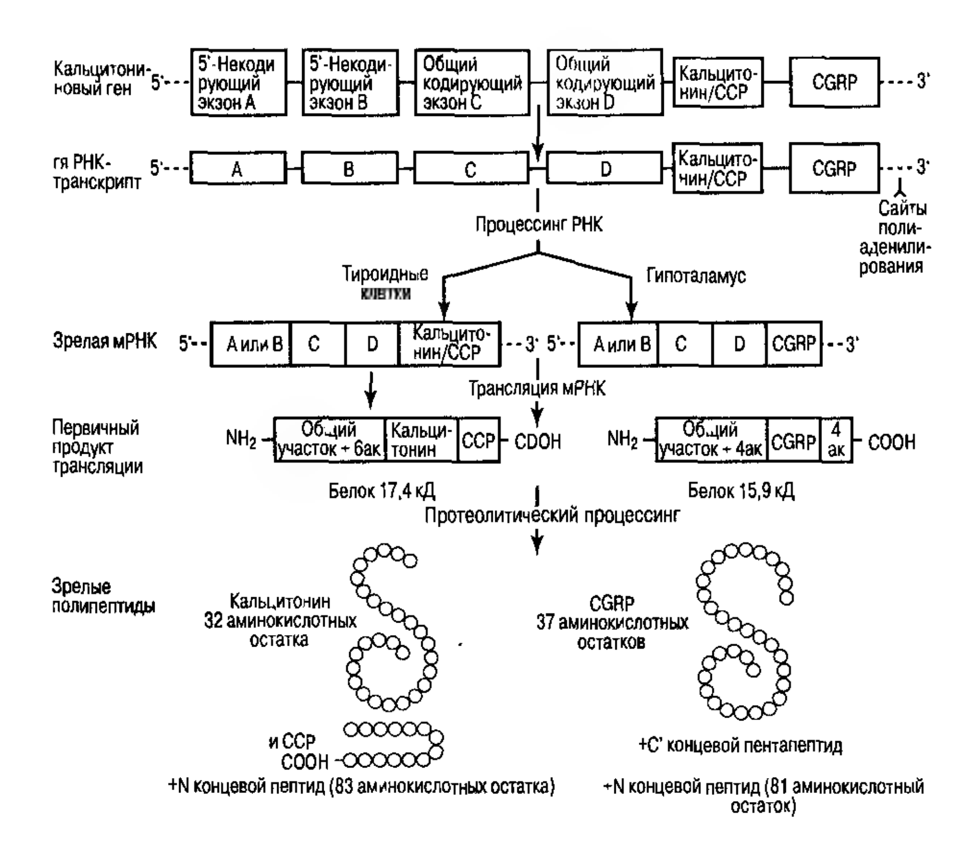


Рис. 4.15. *Альтернативные сайты полиаденилирования в кальцитониновом гене.* (По: Айала и Кайгер, 1988)

В результате альтернативного сплайсинга образуется мРНК двух типов, которые различаются по составу 3'-концов

тате которого в зрелой мРНК отсутствуют экзоны с 5' и 3'-концов и середины гена, представлен на рис. 3.8. Эти различные формы мРНК были обнаружены в мышцах, мозге и фибробластах.

4.3.1. КЛАССИФИКАЦИЯ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ МАТРИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ

Биохимические процессы в клетке принято делить на матричные и нематричные. К матричным относят синтез ДНК, РНК и белков, их созревание и модификацию, а к нематричным – синтез низкомолекулярных соединений: аминокислот, азотистых оснований, сахаров. В зависимости от того, какие именно процессы контролируют те или иные гены, их подразделяют на:

- гены, контролирующие структуру белков, которые участвуют в процессах синтеза аминокислот, азотистых оснований, сахаров;
- гены, отвечающие за синтез рибосомной и транспортной РНК;
- гены, контролирующие синтез белков, которые обеспечивают матричные процессы: репликацию, транскрипцию и трансляцию.

По другой классификации гены делят на три класса в зависимости от типа РНК-полимеразы, которая их транскрибирует:

- гены рибосомных РНК: *18S, 5,8S, 28S,* транскрибируемые РНК-полимеразой I;
- гены, кодирующие белки, транскрибируемые РНК-полимеразой II;
- гены 5SрРНК, тРНК, мя (малых ядерных) РНК, транскрибируемые РНК-полимеразой III.

4.3.2. ГЕНЫ РИБОСОМНОЙ РНК

Гены рРНК организованы в мультигенное семейство. Число рибосомных генов *18S* и *28S* колеблется от 100 у мыши до 280 у человека и 780 у шпорцевой лягушки (*Xenopus*). Для обеспечения синтеза многочисленных белков в клетке нужны рибосомы, а в их образовании участвуют различные фракции РНК. Рибосомные гены, как правило, локализованы в районе ядрышкового организатора (ЯОР). После отхождения

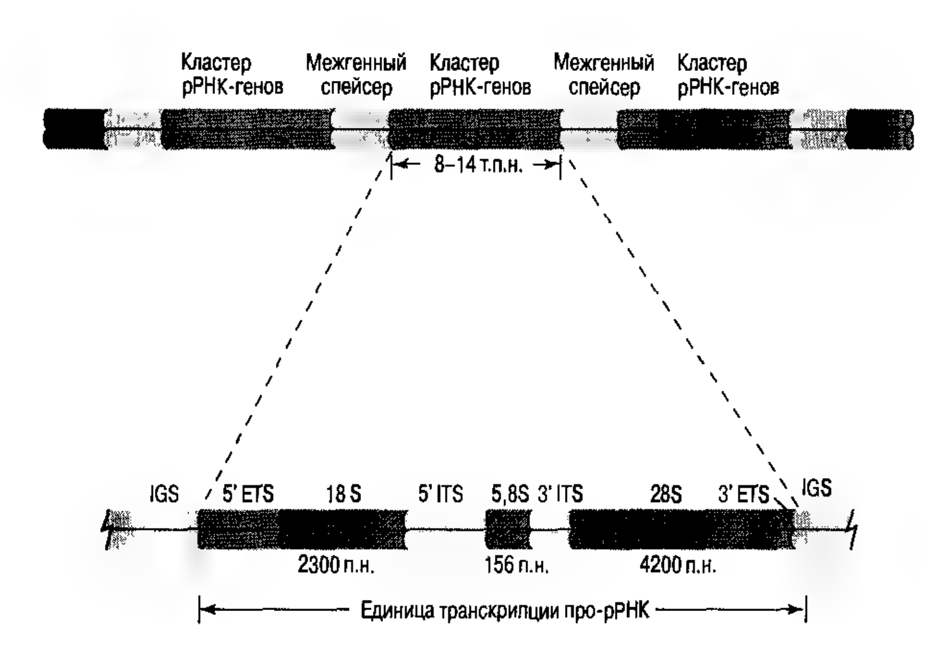


Рис. 4.16. Кластеры трех рибосомных генов (*18S, 5,8S, 28S*) разделены нетранскрибируемыми спейсерами. (Из: Сингер и Берг, 1998)

ядрышка от этого участка образуется вторичная перетяжка и спутник, который не всегда заметен при световой микроскопии. Кластеры генов: *18S*-, *5,8S*- и 28S-рРНК тандемно повторяются в районе ядрышкового организатора. Эти три гена разделены двумя транскрибируемыми спейсерами (ITS), имеются также внешние спейсеры (ETS) и межкластерные спейсеры (IGS) с промотором и терминатором (рис. 4.16).

У человека рибосомные гены *18S*, *5,8S* и *28S* расположены в коротких плечах акроцентрических хромосом: 13, 14, 15, 21, 22; для них характерна также тандемная организация в районах ядрышковых организаторов. В геноме наблюдается индивидуальная и возрастная изменчивость по числу копий на хромосому.

Гены *5S*-рРНК (120 п.н.) также умеренно повторены в геноме. У человека имеется около 2 000 таких генов. Причем они локализованы отдельно от других рибосомных генов. Фракция *5S*-рРНК входит в состав большой субъединицы эукариотической рибосомы, гены этого типа, как правило, локализованы вне ядрышкового организатора.

Для генов *5S*-рРНК характерны следующие особенности:

- как правило, они имеют кластерную организацию;
- в одну единицу повтора входит ген и его псевдоген
- гены *5S*-рРНК в соматических клетках и ооцитах могут несколько отличаться по последовательности нуклеотидов;
- частота повтора генов 5S-рРНК достигает 2000 у человека и 24000 у лягушки *Xenopus*.

4.3.3. ГЕНЫ, КОДИРУЮЩИЕ СТРУКТУРНЫЕ БЕЛКИ И ФЕРМЕНТЫ

В состав эукариотического гена, кодирующего полипептидную цепь, входят: структурная часть и фланкирующие регуляторные участки с 5′и 3′-сторон.

Структуру эукариотического гена рассмотрим на примере β-глобинового гена, состоящего из 3 экзонов и 2 интронов (рис. 4.14). Между первым и вторым экзоном расположен интрон IVS-1, а между вторым и третьим – IVS-2. Последовательности этих интронов идентичны у β-, γ- и δ-генов, но отличаются от последовательности более коротких интронов у α-глобиновых генов.

В промоторе β-глобинового гена человека, наряду с ТАТА- и СААТ-боксами, расположенными на расстоянии от точки инициации транскрипции в 30 и 80 пар нуклеотидов, соответственно, имеется еще и третий элемент PuCPuCCC, где Pu – пурин. ACATTTG – кэп-последовательность кодирует 5′-конец РНК, к которому после синтеза первых трех десятков нуклеотидов присоединяется, модифицированный в 7-м положении метилированный гуанозин-5′-трифосфат. Между сайтами инициации транскрипции и трансляции расположена лидерная последовательность.

В β-глобиновом гене сайт терминации расположен через 1000 нуклеотидов от последнего экзона. Сигналом к разрезанию РНК-цепи служит появление участка AAUAAA. Сделав разрез примерно через 20 оснований после AAUAAA-мотива в молекуле РНК, поли-А-полимераза присоединяет «хвост» из 220 остатков адениловой кислоты. Однако транскрипция продолжается и после AATAAA-сайта до сайта тер-

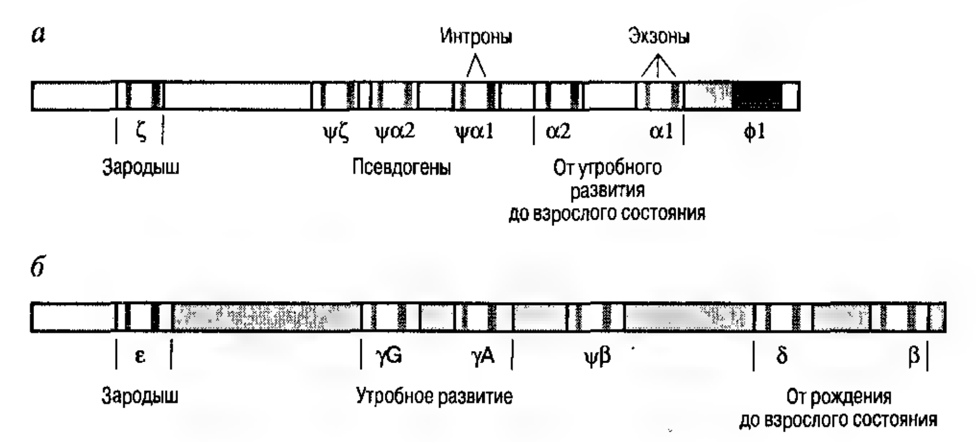


Рис. 4.17. Кластеры глобиновых генов в хромосомах 16(*а*) и 11(*б*) человека и стадии развития, на которых они экспрессируются. (По: Russel, 1998)

минации транскрипции. В этой 3′-концевой зоне (через 600–900 оснований после ААТААА-сайта) расположен энхансер, необходимый для организации экспрессии β-глобинового гена в предшественниках зрелых эритроцитов. С 5′-стороны за 6-22 т.п.н. до кластера β-глобиновых генов расположена область, называемая LCR (от англ. *locus activation region*), включающая несколько эритроидспецифичных энхансеров, положение которых совпадает с положением участков гиперчувствительности к ДНКазе-1. В участках гиперчувствительности II-IV картированы многочисленные участки связывания различных транскрипциионных факторов. Подробнее об этом регуляторном участке в связи с особенностями его функционирования см. в гл. 12.

Гены глобинов человека образуют два мультигенных семейства. α-Глобиновые гены локализованы в коротком плече 16-й хромосомы в следующей последовательности: ζ-ген, кодирующий ζ-цепи эмбриональных гемоглобинов Gower 1 и Portland 1, затем три псеадогена – ψζ и ψα2, ψα1 и к 3′-концу в этом кластере – α2- и α1-гены (рис. 4.17, *а*). Кластер β-генов расположен в коротком плече 11-й хромосомы (11р) в следующей последовательности: ε-ген эмбриональной цепи; два гена фетальных цепей гемоглобина HbF – $^{A}\gamma$ и $^{G}\gamma$, которые отличаются по одному кодону; псевдоген β-цепи; δ-ген, кодирующий δ-цепь гемоглобина взрослого человека HbA2 и β-ген (рис. 4.17, *б*). В такой же последовательности эти гены начинают функционировать на различных этапах онтогенеза. Кластерная организация глобиновых генов напоминает оперонную структуру прокариот. Однако у прокариот в структуре оперона есть общие регуляторные последовательности: промотор, оператор, терминатор. В то время как каждый из глобиновых генов имеет свои регуляторные последовательности.

4.3.4. ГЕНЫ тРНК

Гены тРНК умеренно повторены в геноме, их число измеряется в сотнях и тысячах: 850 – у дрозофилы, 1150 – у шпорцевой лягушки, 1300 – у человека. У прокариот

промотор примыкает к 5'-концу структурной части гена, а у эукариот промотор расчленен и находится внутри гена, один блок которого находится на расстоянии 8–30 п.н. левее инициирующего кодона, а второй – правее на +51 п.н. (глава 12). В промоторе гена тРНК имеются А- и В-боксы. Установлены их канонические последовательности. При уменьшении расстояния между боксами транскрипция снижается или полностью прекращается. Замена всего одного нуклеотида в В-боксе в положении 56 CG → GC в TψCG-петле искажает правильную структуру тРНК.

У прокариот некоторые кластеры с генами тРНК образуют опероны с общим промотором и одним предшественником зрелой РНК. Если есть интрон, расположенный, как правило, рядом с антикодоном, то он вырезается, как и в пре-мРНК. В митохондриях млекопитающих гены тРНК перемежаются со структурными генами.

Таким образом, генетический материал эукариот имеет три уровня организации: геномный, хромосомный и генный, каждый из которых обладает своими структурными особенностями. Гены являются единицей наследственности, они – составные элементы хромосом и генома в целом. Однако в геноме эукариот превалирует некодирующая ДНК (у человека – 97%), функции которой изучены пока недостаточно. Тем не менее, установлена ее роль в альтернативном сплайсинге. Кроме того, в некоторых интронах обнаружены промоторы. Важное значение имеют регуляторные участки, расположенные с 5'- и 3'-концов гена, которые также относятся к некодирующей ДНК. Изучается роль тринуклеотидных повторов как в некодирующей так и в кодирующей ДНК, увеличение числа которых выше нормы приводит к тяжелым заболеваниям (часть II. **Медицинская генетика**). Роль различных уровней организации генетического материала в передаче генетической информации потомкам в норме и патологии (когда генные, хромосомные и геномные мутации приводят к искажению этой информации) рассматриваются в различных главах пособия.

глава 5

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ И НЕАЛЛЕЛЬНЫХ ГЕНОВ

5.1. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ ГЕНОВ

Аллель – одна из альтернативных форм гена. В классической генетике аллелями принято считать альтернативные фенотипические проявления признака у жизнеспособных особей. После открытия молекулярной структуры гена аллель стал трактоваться как один из вариантов нуклеотидной последовательности определенного фрагмента ДНК (как кодирующего, так и не кодирующего) в структуре генома. Например, аллелем называют и вариант длины рестрикционного фрагмента вне зависимости от его локализации, и последовательность варианта повтора сателлитной ДНК. Таким образом, в классической генетике к определению понятия аллель подходили с точки зрения его функционального проявления (различные варианты признака), а в молекулярной генетике учитывается прежде всего изменение структуры определенной последовательности ДНК. При этом в случае некодирующей ДНК аллель, как правило, не имеет никакого фенотипического проявления. В этом, видимо, заключается защитная функция некодирующей ДНК от мутаций в ее структуре с фенотипическим проявлением. Вместе с тем показано, что изменения в последовательности оснований в регуляторных 5'- и 3'-нетранслируемых областях генов, интронах и сайтах сплайсинга могут привести к тяжелым заболеваниям у человека (см. гл. 13 и ч. II **Медицинская генетика**).

Между аллелями одного гена существуют различные типы взаимодействия доминирование, неполное доминирование, кодоминирование, сверхдоминирование. В конце 70-х годов XX века Р. Ригером было предложено включить в эту классификацию еще два типа взаимодействия: неустойчивую доминантность и условную доминантность.

5.1.1. ДОМИНИРОВАНИЕ НОРМАЛЬНЫХ И МУТАНТНЫХ АЛЛЕЛЕЙ

Термины «доминантный» и «рецессивный» признаки были введены Менделем в его работе «Опыты над растительными гибридами» (см. гл. 1). Доминантные признаки могут быть как нормальными, так и мутантными. Вне зависимости от локализации гена (в половой хромосоме или аутосоме) доминантные признаки проявляются в каждом поколении. Доминантный признак, контролируемый аутосомным геном, на-

Таблица 5.1. **Варианты фенотипического проявления доминантных мутаций**

Символ мутации	Полное название	Хромосома	Объект	Фенотип
S	*Star*	2	Дрозофила	Глаза маленькие, узкие, грубые, леталь в гомозиготе
Su (S)	*Suppressor of Star*	2	Дрозофила	Супрессирует *Star*
E(S)	*Enhancer of Star*	2	Дрозофила	Глаза грубые, усиливает проявление некоторых аллелей *Star* и *asteroid* (*ast*). У *ast* глаза маленькие, грубые, жилки крыльев недоразвиты
Curly	*Cy*	2	Дрозофила	Крылья загнуты вверх, леталь в гомозиготе
Cpt	*Clipt*	2	Дрозофила	Щетинки короткие, леталь в гомозиготе, самцы стерильны
D	*Dichaete*	3	Дрозофила	Крылья раскинуты, жужжальца отсутствуют, уменьшено количество дорсоцентральных щетинок, леталь в гомозиготе
Bg	*Bag*	1 (X)	Дрозофила	Крылья вздуты, жилки дефектны, самцы гибнут
Gpd-1	*Glucose-6-phosphate dehydrogenase*	VIII	Мышь	Электрофоретическая подвижность глюкозо 6 фосфатдегидрогеназы изменена
Lp	*Loop tail*	XIII	Мышь	Белые пятна на шкурке, макроцитарная анемия, стерильность
Tr	*Tremler*	VII	Мышь	Конвульсии в раннем возрасте, у взрослого животного тремор головы
T	*brachyury*	IX	Мышь	Хвост короткий у гетерозигот *T/+*, гомозиготы *T/T* гибнут на 10-й день эмбрионального развития, хорда отсутствует, задняя часть тела не развивается

следуется по аутосомно-доминантному типу, а при локализации гена в половой хромосоме – по сцепленному с полом доминантному типу (см. гл. 2). Различия этих двух типов наследования заключаются в том, что аутосомно-доминантные признаки с одинаковой вероятностью передаются особям как мужского, так и женского пола, в то время как доминантные сцепленные с полом нормальные признаки или патологические мутации передаются от отца только дочерям. Если же родители оба больны и при этом мать гетерозиготна, то здоровыми могут быть только сыновья и то с вероятностью 50% (см. ч. II. **Медицинская генетика**).

Кроме того, доминантные мутации могут быть летальными в гомозиготном состоянии, они способны усиливать или ослаблять действие других неаллельных генов, приводить к стерильности особей, одновременно влиять на различные признаки (примеры в табл. 5.1.).

Как видно из этой таблицы доминантными могут быть не только морфологические признаки, но и биохимические, физиологические, поведенческие.

5.1.2. НЕПОЛНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ

В одном из скрещиваний, которые проводил Мендель, доминантный признак не полностью исключал проявление рецессивного признака. При скрещивании круплолистного сорта гороха с мелколистным в первом поколении наблюдался *промежуточный фенотип*: листья имели среднюю величину. В последующих экспериментах выяснилось, что, обусловленный неполным доминированием одного аллеля над другим промежуточный фенотип у гибридов первого поколения встречается у различных организмов.

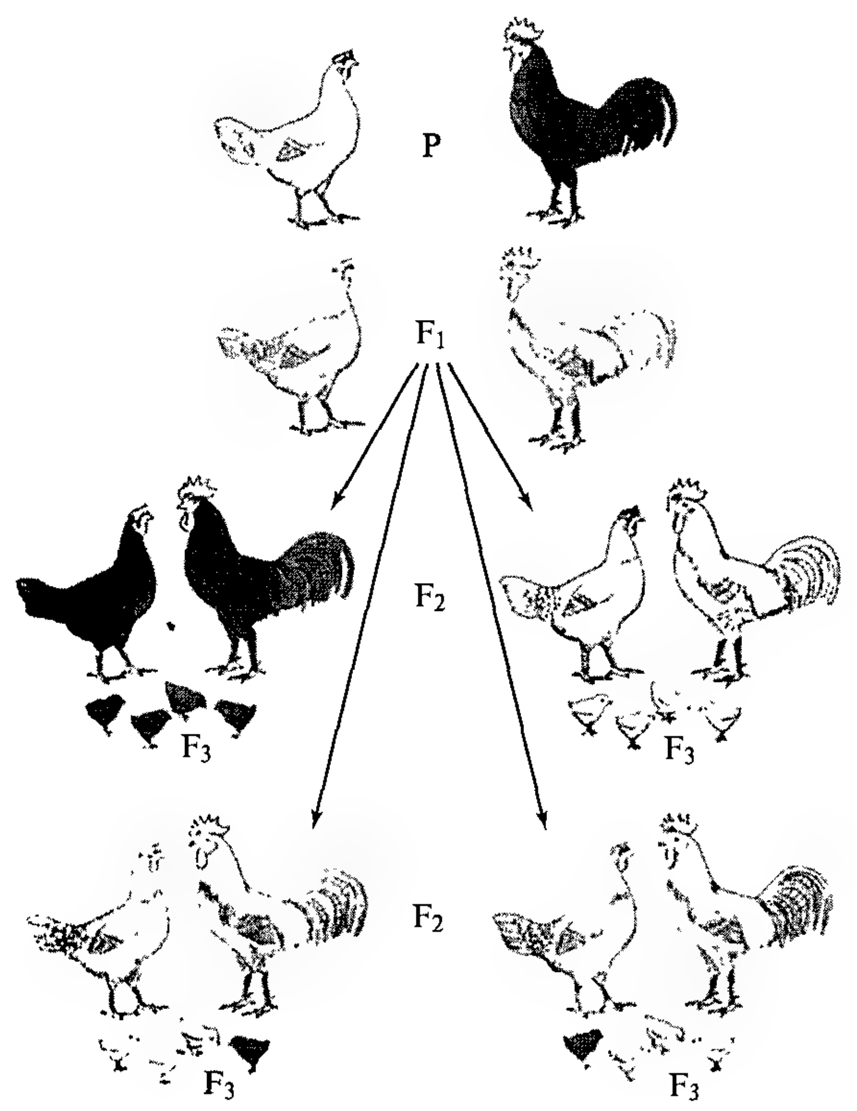


Рис. 5.1. Неполное доминирование у кур. (Из: Айала и Кайгер, 1988)

При неполном доминировании могут наблюдаться некоторые вариации признака у гибридов с отклонениями в сторону доминантного или рецессивного фенотипа. Если выражение признака у гетерозигот примерно промежуточное, то такие признаки называются **полудоминантными**. Так у львиного зева (*Antirrhinum majus*) и ночной красавицы (*Mirabilis jalapa*) гибриды от скрещивания красноцветковых растений с белоцветковыми имеют розовую окраску. Другим примером полудоминантного признака может служить окраска оперения у кур андалузской породы. При скрещивании белых кур с черными петухами, потомство F_1 имеет серую окраску, в то время как во втором поколении у 1/4 птиц окраска оперения черная, у 1/2 серая и у 1/4 белая (рис. 5.1).

5.1.3. КОДОМИНИРОВАНИЕ

В случае кодоминирования у гетерозигот полностью проявляются оба аллеля. Наиболее яркий пример кодоминирования – наследование групп крови АВО у человека. Группы крови О (I), А (II), В (III), АВ (IV) детерминируются геном *I* (для обозначения генов принят курсивный шрифт). Известны три основных аллеля этого гена, два из которых I^A и I^B доминантные, а один I^O – рецессивный. При гомозиготности I^AI^A эритроциты имеют только поверхностный антиген А (группа крови А). При гомозиготности I^BI^B эритроциты несут другой антиген – В (группа крови В). В случае гомозиготности I^OI^O эритроциты лишены обоих антигенов (группа крови О). У гетерозигот I^AI^O или I^BI^O в соответствии с имеющимся антигеном группа крови А или В. У гетерозигот I^AI^B эритроциты несут оба антигена А и В (группа крови АВ).

Как правило, на уровне синтеза полипептидов аллели гетерозигот кодоминантны. Так у гетерозигот по серповидноклеточной анемии *HbA/HbS*, гемоглобины HbS составляют 35–42%, HbA 60–65%. Полная клиническая картина заболевания (тромбозы мелких сосудов, инфаркты внутренних органов, гемолитическая анемия, гиперплазия костного мозга, нарушения мозгового кровообращения; смерть в возрасте 3 -10 лет, иногда позже) проявляется только в случае гомозиготности по *HbS*. У гомозигот мутантный гемоглобин $Hb\alpha_2\beta_2 6^{Глу \to Вал}$ состоит из двух нормальных α-цепей и двух мутантных β-цепей, в 6-м положении которых глутаминовая кислота заменена валином. Заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу, наличие у гетерозигот до 65% нормального гемоглобина позволяет большинству из них чувствовать себя здоровыми. Однако в холодное время года, при повышенной нагрузке, а также при полетах на самолете у них появляются боли в суставах, сердце, брюшной полости, в области селезенки, что свидетельствует о неполной доминантности нормального аллеля *HbA* в экстремальных условиях у носителей мутантного аллеля *HbS*. Таким образом, кодоминантность у гетерозигот *HbA/HbS* проявляется только на уровне синтеза полипептидных цепей гемоглобина, а заболевание с полной клинической картиной наследуется по аутосомно-рецессивному типу.

5.1.4. СВЕРХДОМИНИРОВАНИЕ

При сверхдоминировании наблюдается более сильное проявление признака гетерозигот по сравнению с исходными гомозиготными родительскими формами. Так гетерозиготы по серповидноклеточной анемии обладают большей резистентностью к

тической малярии, вызываемой протозойным паразитом *Plasmodium falciparum*, индивиды, гомозиготные по нормальному доминантному аллелю гена, определяющего форму эритроцитов: *HbA/HbA* < *HbA /HbS* > *HbS/HbS*.

Другим примером может служить сверхдоминирование, наблюдаемое по такому знаку, как плодовитость у дрозофилы. Экспериментально показано, что у гетеригот по отдельным мутациям наблюдаются более высокие показатели плодовити, чем у родительских линий. Такая повышенная мощность гибридов первого коления носит название **«гетерозис»**. Как правило, по количественным признакам блюдается гетерозис, основанный на гетерозиготности по многим генам, но возжны случаи гетерозиса у гетерозигот по одной паре аллелей, плейотропно влияюх на такие признаки, как плодовитость, длительность жизни, вес и др.

Эффект моногибридного гетерозиса был обнаружен у гибридов между мутантми и нормальными линиями *Drosophila melanogaster*. Мух *cinnabar*, *cn* (ярко-красые глаза) и *ebony*, *e* (черное тело) скрещивали с нормальными мухами линии *nton-S* (рис. 5.2). Учет яйценоскости гибридов (суммарное число отложенных яиц) оводили ежедневно в течение всей жизни мух. Гибриды между мутантными (*cn* и и нормальными мухами (*Canton-S*) достоверно превышали по плодовитости исдные линии. Наибольшая плодовитость была выявлена у гибридов *CS* × *e*, она окаась в 1,4 раза выше, чем у мух *ebony* и в 3 раза превышала плодовитость линии *nton-S*.

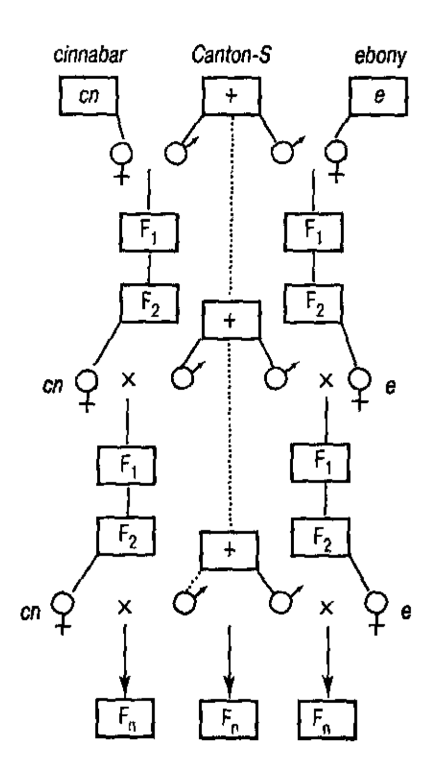


Рис. 5.2. Схема скрещивания для выведения линий с «выравненными» генотипами

Гомозиготы по рецессивным мутациям cn и e скрещивались с мухами Canton-S

5.1.5. НЕУСТОЙЧИВАЯ И УСЛОВНАЯ ДОМИНАНТНОСТЬ

Термин «*неустойчивая доминантность*» применим к тем случаям, когда проявление признака у гетерозиготных особей зависит от внешних условий или генетической среды. Так, фенотип доминантной мутации *Curly* (загнутые кверху крылья) у дрозофилы не проявляется при температуре 19 °С, (мухи имеют прямые крылья). Вполне нормально выглядят и мутантные мухи *Abnormal abdomen* (аномальное брюшко) в старых культурах на подсохшем корме, т.е. доминантные мутации при определенных условиях проявляются как нормальные или близкие к норме рецессивные признаки.

Генотип можно рассматривать как систему взаимодействующих генов. Проявление признака определяется взаимоотношением не только аллельных, но и неаллельных генов, усиливающих или ослабляющих действие основного гена. О степени доминирования признака судят по его пенетрантности (термин «пенетрантность» предложен Н.В. Тимофеевым-Ресовским), оцениваемой по доле особей-носителей гена, у которых данный признак проявился. В проведенных В.Г. Митрофановым экспериментах самок из линии *Puffed*, *Pu* (фасетки глаз слиты и образуют вздутия) *Drosophila virilis* скрещивали с нормальными самцами из разных популяций. В результате мутация *Puffed* оказывалась в разном генетическом окружении. Было установлено, что у гибридов первого поколения в одном из вариантов скрещиваний пенетрантность не превышала 2% (почти полная рецессивность), в другом достигала 98%, а в остальных находилась на уровне ±50%. Это означает, что доминантность основного гена *Pu* зависит от генетического фона, усиливающего или ослабляющего его проявление.

Наконец, доминантность может зависеть от положения гена в хромосоме. В классической генетике описано много примеров эффекта положения. Так у гетерозигот w^+/w^1 может проявиться фенотип не доминантного аллеля w^+ (красные глаза), а рецессивного – *w* (белые глаза), если аллель w^+ в результате инверсии (изменения последовательности генов на участке хромосомы на обратную) попадет в зону прицентромерного хроматина (рис. 5.3).

В тех случаях, когда гомозигот по доминантной мутации выявить не удается, поскольку доминантный ген действует в гомозиготе как рецессивная леталь, говорят об условной доминантности. Например, доминантные мутации у дрозофилы *Curly*, *Cy* (загнутые кверху крылья), *Pearl*, *Pr* (утолщения на крыльях, глаза маленькие, грубые), *Scutoid*, *Sco* (скутеллярные щетинки отсутствуют) можно назвать условно доминантными, поскольку они как и многие другие, летальны в гомозиготе.

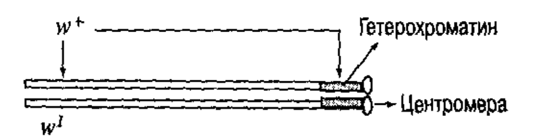


Рис. 5.3. Эффект положения гена *white*

У гетерозигот $In(1)w^+/w^1$ проявляется фенотип рецессивного аллеля w (белые глаза). $In(1)w^+$ – инверсия в 1-й хромосоме

5.1.6. МНОЖЕСТВЕННЫЕ АЛЛЕЛИ

Известны различные серии множественных аллелей, в которых мутации могут быть по отношению друг к другу доминантными, рецессивными, проявлять неполное доминирование, сверхдоминирование и кодоминирование. Так у дрозофилы была обнаружена серия множественных аллелей по гену *white*, состоящая из нескольких десятков мутантных и одного нормального аллеля. В настоящее время их известно более 1400. В серии *white* аллель w^+ доминирует над всеми рецессивными аллелями ряда. Аллель *w* (белые глаза), открытый Т. Морганом в 1910 г., рецессивен по отношению ко всем остальным аллелям; другие аллели проявляют неполное доминирование при сочетании в гетерозиготе с аллелями, определяющими менее интенсивную окраску глаз у дрозофилы. Например, у гетерозигот по w^a (абрикосовые глаза) и *w* наблюдается промежуточный фенотип (светло-абрикосовые глаза). Интересно, что в этом гене помимо доминантного нормального аллеля обнаружены и другие доминантные мутации, например, аллель w^{BWX} (коричневые глаза) и w^{DZL} (светло-желтые глаза у самок и близкие к дикому типу у самцов).

Некоторые аллели имеют *плейотропный* эффект, т.е. оказывают влияние на другие признаки. Так мутантные аллели, как правило, снижают жизнеспособность и плодовитость особей.

5.1.7. СООТНОШЕНИЕ ПО ФЕНОТИПУ ПРИ РАЗНЫХ ТИПАХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АЛЛЕЛЕЙ

При разных типах взаимодействия аллелей одного гена могут наблюдаться отклонения от менделевского расщепления по фенотипу 3:1. Наследование признаков, зависящих в своем развитии от взаимодействия аллельных генов, подчиняется законам Менделя, если один из этих признаков является доминантным, а другой рецессивным. При других типах доминирования это отношение может несколько модифицироваться.

При неполном доминировании аллеля *А* над *а* в F_2 моногибридного скрещивания расщепления по фенотипу и генотипу (1/4 *АА* : 1/2 *Аа* : 1/4 *аа*) совпадают, поскольку у гетерозигот *Аа* проявляется промежуточный фенотип.

При кодоминировании аллелей также получается соотношение по фенотипу и генотипу 1:2:1. Например, у гетерозиготных родителей с IV группой крови ($I^A I^B \times I^A I^B$) вероятность рождения детей с генотипами, определяющими группы крови А (II), АВ (IV) и В (III) составит 1/4 $I^A I^A$:1/2 $I^A I^B$:1/4 $I^B I^B$.

В случае сверхдоминирования гетерозиготы будут встречаться с большей частотой, чем та, которая ожидается при равной их жизнеспособности с гомозиготами. Например, при скрещивании нормальных по окраске тела самок дрозофилы с самцами *ebony* (черное тело): +/+ × *e/e*, во втором поколении ожидается отношение 1/4 +/+ : 1/2 +/*e* : 1/4 *e/e*. Однако в силу большей плодовитости гетерозиготных самок +/*e* по сравнению с гомозиготами, и, видимо, большей жизнеспособности гетерозиготного потомства, общее число нормальных мух может оказаться более чем

3/4 (1/4 +/+ : 2/4 +/*e*). Было показано, что в экспериментальных популяциях рецессивная мутация *ebony* не элиминируется и через много поколений, сохраняясь с частотой до 5%.

Соотношение по фенотипу зависит также от уровня пенетрантности по доминантным и рецессивным признакам. При 100%-ной пенетрантности наблюдается менделевское расщепление по фенотипу 3*A*/_:1 *a*/*a*. При пенетрантности, равной 50%, во втором поколении гибридов ожидается 3/8 (3/4 × 1/2) особей с доминантным фенотипом и 5/8 – с рецессивным или 3:5.

5.1.8. О МЕХАНИЗМАХ ДОМИНАНТНОСТИ И РЕЦЕССИВНОСТИ

Первой попыткой объяснить доминантность была гипотеза присутствия-отсутствия. В ее разработке в начале XX века участвовали Дж. Лотси, Р. Пеннет, У. Бэтсон. Согласно этой гипотезе рецессивность означает отсутствие гена или его инактивацию. Однако в более поздних экспериментальных работах было показано, что рецессивные гены могут мутировать в разных направлениях, как к доминантному, так и к новым рецессивным состояниям. Являясь наследственными изменениями структуры гена, мутации могут быть вызваны делециями (как генными, так и хромосомными). Генные делеции (выпадение части гена или всего гена) и хромосомные делеции (утрата участка хромосомы) у одного из гомологов могут оказаться летальными в случае важности данного локуса для выживания организма. Такие локусы называют *гаплолетальными*. Делеции другого типа проявляются в гетерозиготном состоянии как доминантные видимые мутации; как рецессивные летали, они действуют только в гомозиготном состоянии. К ним относятся такие мутации у *Drosophila melanogaster* как *D* – *Delta* (концы крыльев дельтообразные, жилки утолщены, в гомозиготе – леталь), *H* – *Hairless* (щетинки редкие, жилки недоразвиты, в гомозиготе – леталь), *Ly* – *Lyra* (края крыльев вырезаны, в гомозиготе – леталь), *Minute* (щетинки тонкие, позднее вылупление имаго).

Описаны доминантно наследуемые заболевания, обусловленные генными делециями. У человека в каждой из двух хромосом шестнадцатой пары имеется два гемоглобиновых гена *a1* и *a2*; ген *a1* кодирует α-цепь в гемоглобине HbA, а *a2* – в HbA2. Таким образом, в диплоидном геноме человека присутствуют четыре гена *a*. Нормальный гемоглобин взрослых людей состоит из двух α- и двух β-цепей. Известны наследуемые по аутосомно-доминантному типу α-талассемии, вызванные делециями различного числа генов. Делеции двух генов α у гетерозигот приводят к слабо выраженной анемии. Тяжелая форма этого заболевания HbH (гепато- и спленомегалия, гипертрофия костей, кардиомегалия) вызвана отсутствием трех генов. К летальному исходу приводит выпадение всех четырех генов (водянка плода с Hb Bart-гемоглобином, состоящим из четырех γ-цепей).

Другой пример. Делеция в миелиновом гене *PMP22* на хромосоме 17 размером в 1,5 млн п.н. вызывает наследственную нейропатию с предрасположенностью к параличам от сдавления, наследуемую по доминантному типу.

В последние десятилетия благодаря использованию современных методов исследования появляется все больше сведений о молекулярных механизмах доминантно-

ти и рецессивности. Первичными продуктами гена, синтезированными в процессе считывания информации с РНК на белок (трансляция) являются структурные белки и ферменты. У гетерозигот синтезируются как нормальные, так и мутантные полипептидные цепи, кодируемые разными аллелями одного гена. При этом очень важно, какого количества белка, кодируемого нормальным геном, достаточно для обеспечения нормального фенотипа. Рецессивные мутации не проявляются у гетерозигот при синтезе примерно половины нормального белка. И, напротив, гетерозиготы по доминантным мутациям обладают мутантным фенотипом, если синтезированный нормальный белок не может компенсировать присутствие мутантного белка. В случае мультимерных или субъединичных белков, состоящих из нескольких субъединиц, важно какие именно нарушения произошли в структуре белка. При доминантных заболеваниях чаще, встречается нарушение агрегации субъединиц белка, недостаточный синтез белка или полное его отсутствие, дефекты клеточных рецепторов и белков мембраны. Однако различные изменения, происходящие с одним и тем же белком, могут наследоваться по-разному. Например, замена аминокислот в гемоглобине характерна для многих рецессивно наследуемых гемоглобинопатий, а недостаточный синтез гемоглобина HbA или полное его отсутствие наследуется по доминантному типу (α-талассемии). Рецессивные заболевания, связанные с нарушениями обмена веществ, как правило, вызваны недостаточной активностью ферментов, например: алкаптонурия, галактоземия, фенилкетонурия (подробнее обо всех перечисленных в этом разделе заболеваниях, см. в гл. 21). Рецессивные патологии могут обусловливаться и дефектами неферментных белков (спинальная мышечная атрофия, наследственные моторно-сенсорные нейропатии), в том числе мембранных (муковисцидоз, мышечная дистрофия Дюшенна/Бекера). Данные, приведенные в монографии С.Н. Иллариошкина, посвященной наследственным заболеваниям нервной системы, свидетельствуют о том, что сходные нарушения структурных белков и ферментов имеют место при разных типах наследования.

5.2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕАЛЛЕЛЬНЫХ ГЕНОВ

Генотип любого организма представляет собой сложную систему взаимодействующих генов как аллельных, так и неаллельных. При этом число генов, существенно влияющих на какой-либо признак, по-видимому, ограничено, иначе повреждение только одного гена, а их у человека не менее 30 000, приводило бы к изменению всей генетической системы.

5.2.1. КОМПЛЕМЕНТАРНОСТЬ

Под комплементарностью понимают такой тип взаимодействия генов, при котором два гена вместе обусловливают развитие нового признака, отличного от родительских вариантов. Существует не менее трех типов комплементарности:

Рис. 5.4. Форма гребня у кур: простой, ореховидный, гороховидный, розовидный. (Из: Griffiths et al. 1993)

- доминантные гены различаются по фенотипическому проявлению;
- доминантные гены имеют сходное фенотипическое проявление;
- и доминантные, и рецессивные гены имеют самостоятельное фенотипическое проявление.

Если доминантные аллели двух генов обусловливают разный фенотип, то в F_2 наблюдается расщепление 9:3:3:1. В качестве примера данного типа взаимодействия генов можно привести наследование формы гребня у кур (рис. 5.4.).

У гибридов первого поколения (F_1) доминантные гены *A* и *B* дополняют друг друга и вместе обусловливают ореховидную форму гребня, которой не было у родительских форм. При скрещивании гибридов F_1: *AaBb* × *AaBb* во втором поколении, наряду с ореховидной, розовидной и гороховидной появляется простая форма гребня в соотношении: 9 *A_ B_* : 3 *A_ bb* : 3 *aa B_* : 1 *aa bb* («_» означает, что аллель в гомологичной хромосоме может быть как доминантным, так и рецессивным). В отличие от менделевского расщепления, наблюдаемого во втором поколении дигибридного скрещивания, в данном случае в первом поколении два гена действуют на один признак.

При другом варианте комплементарности доминантные аллели двух взаимодействующих генов не имеют собственного фенотипического проявления: новый фенотип у гибридов определяется одновременным присутствием в генотипе двух неаллельных доминантных генов.

Так, у тутового шелкопряда *Bombyx mori* желтая окраска кокона определяется наличием в генотипе двух доминантных генов – *A* и *B*, при наличии в генотипе только одного из этих генов, а также у двойных гомозигот *aabb* – окраска кокона белая. Поэтому в F_2 у 7/16 коконов окраска белая, а у 9/16 *A_B_* – желтая.

P *AAbb* × *aaBB*
белые коконы белые коконы

F_1 *AaBb*
желтые коконы

F_2 9/16 *A_B_* : 3/16 *A_ bb* : 3/16 *aa B_* : 1/16 *aa bb*
желтые коконы (9) белые коконы (7)

5.2.2. ДОМИНАНТНЫЙ И РЕЦЕССИВНЫЙ ЭПИСТАЗ

При эпистазе происходит подавление действия одного гена другим, не аллельным геном: *A* > *B* или *A* > *bb*. Гены, подавляющие действие других генов, называют *инги-*

орами или *супрессорами*. Они могут быть как доминантными, так и рецессивны-

При **доминантном эпистазе** один доминантный ген подавляет проявление друго- оминантного гена.

Зозможны два варианта доминантного эпистаза

. Гомозиготы по рецессивным аллелям фенотипически отличаются от генотипов минантными аллелями.

У тыквы *Cucurbita pepo* окраска плода может быть желтой (*A*) и зеленой (*a*). Эта аска может подавляться доминантным ингибитором (*I*), в результате чего плоды 4_; *I_ aa*) получаются белыми.

P: *IIAA* × *iiaa*
белая зеленая
F_1: *IiAa*
белая
F_2: 9/16 *I_A_*; 3/16 *I_ aa*; 3/16 *ii A_*; 1/16 *ii aa*
белые (12) желтые (3) зеленые (1)

В описанном и аналогичных случаях в F_2 имеет место расщепление по фенотипу :1.

2. Гомозиготы по рецессивным аллелям *iiaa* не отличаются по фенотипу от *I_A* *I_ aa*. Например, у кукурузы *Zea mays* окраска зерна может быть пурпурной (*A*) лой (*a*).

У 9/16 растений *I_A_* при наличии доминантного ингибитора *I* пигмент не син- іруется. У 3/16 растений с генотипом *I_ aa* и у 1/16 *ii aa* отсутствует ген пурпур- окраски, поэтому зерна в початках кукурузы также белые. И только у 3/16 *ii A_* аска зерен пурпурная, поскольку в генотипе есть ген окраски, а ингибитор пред- лен рецессивным аллелем. Таким образом, в F_2 соотношение растений с окра- нными и неокрашенными зернами 13:3.

P: *IIAA* × *iiaa*
белая белая
F_1: *IiAa*
белая
F_2 9/16 *I_A_*; 3/16 *I_ aa*; 1/16 *ii aa*; 3/16 *ii A_*
белые (13) пурпурные (3)

При **рецессивном эпистазе** рецессивный аллель одного гена подавляет действие ллельного доминантного гена *aa* > *B_*, а между доминантными генами наблюда- і комплементарность.

Например, у льна *Linum usitatissimum* аллель *A* определяет окрашенный венчик, - неокрашенный (белый), *B* — голубой, *bb* — розовый. По-видимому, ген *A* необ- им для синтеза предшественника пигмента, без которого ни голубой, ни розовый менты не образуются. Гетерозиготные растения *A_B_* имеют голубую окраску чика (комплементарность доминантных генов), *Aabb* — розовую, тогда как рецес- ные аллели гена *a* в гомозиготном состоянии подавляют синтез как голубого пиг-

мента в генотипах *aaBB* и *aaBb*, так и розового пигмента у *aa bb* (рецессивный эпистаз).

Вследствие двух типов взаимодействия генов у льна в F_2 наблюдается расщепление 9:3:4.

P *AAbb* × *aaBB*
розовый белый
F_1 *AaBb*
голубой
F_2: 9/16 *A_B_*; 3/16 *A_ bb*; 3/16 *aa B_*; 1/16 *aa bb*
голубые (9) розовые (3) белые (4)

5.2.3. ДВОЙНОЙ РЕЦЕССИВНЫЙ ЭПИСТАЗ

При таком варианте эпистатического взаимодействия рецессивные аллели имеют собственное фенотипическое проявление; в двойных гомозиготах рецессивные аллели взаимно подавляют друг друга: *aa* > *bb*, а *bb* > *aa*.

Примером может служить взаимодействие мутации дрозофилы *brown*, *bw* (коричневые глаза) с мутациями *vermilion*, *v*; *cinnabar*, *cn*; *scarlet*, *st* и *cardinal*, *cd*, каждая из которых фенотипически проявляется как ярко-красные глаза. Мутации *bw* и *cn* локализованы во второй хромосоме, *st* - в третьей, *v* – в первой хромосоме. Мутации различных генов: *cn*, *st*, *v* и им подобные Х. Нахтсхайм (1946) стал называть **генокопиями**, поскольку они имеют сходный фенотип. Ранее Н.В. Тимофеев-Ресовский называл такие мутации гетерогенными группами генов.

Соотношение по фенотипу в F_2 от скрещиваний мутантов *bw* × *st*, *bw* × *v* зависит от локализации этих генов. При локализации взаимодействующих генов в различных аутосомах (*bw* и *st*) наблюдается расщепление по фенотипу – 9 bw^+ st^+: 3 bw^+ *st* : 3 *bw* st^+ : 1 *bwst* (см. схему). В такой форме записи указаны только те аллели, которые проявляются на фенотипическом уровне, индексы «+» означают нормальные аллели (или аллели дикого типа), доминантные по отношению к *bw*, *v*, и *st*. При этом последовательность записи генов в фенотипе и генотипе соответствует порядковому номеру хромосомы. Например, ген *bw* локализован во второй хромосоме, а *st* – в третьей, поэтому ген *bw* в генотипе *bw/bw*; *st/st* записывается раньше гена *st*.

Генотипы P и F_1:
P: ♀ bw^+/bw^+ ; st/st × ♂ bw/bw; st^+/st^+

F_1: ♀ bw^+/bw; st/st^+ × ♂ bw^+/bw; st/st^+

Обозначения:
/ – гомологичные хромосомы;
верхние индексы «+» над символами мутаций – нормальные аллели генов;
brown, *bw* – коричневые глаза, мутация второй хромосомы;
scarlet, *st* – ярко-красные глаза, мутация третьей хромосомы.

Расщепление по фенотипу в F_2 можно рассчитать по формуле, исходя из гетеро-зиготности самок и самцов по генам *bw* и *st*, и независимого наследования этих ге-нов, локализованных в разных хромосомах:

$(3bw^+ + 1bw) \times (3\,st^+ + 1\,st)$

Фенотипы F_2:

9 bw^+st^+ – темно-красные глаза (нормальные)

3 $bw\,st^+$ – коричневые глаза

3 bw^+st – ярко-красные глаза

1 $bw\,st$ – белые глаза

В случае сцепленного с полом наследования одной из мутаций (v) отношение по фенотипу в F_2 будет иным: 3 + + : 3 *v* + :1 + *bw* : 1*v bw* (см. схему). При скрещивании самок *vermilion* с самцами *brown* в первом поколении самки имеют нормальный фенотип, а самцы – *vermilion*. Исходя из генотипов самок и самцов F_1 по генам *vermilion* $v/v^+ \times v/Y$ и *brown* – $bw/bw^+ \times bw/bw^+$ можно рассчитать по формуле ожидаемое расщепление по фенотипу в F_2: $(1v^+ + 1v) \times (3\,bw^+ + 1\,bw) = 3\,v^+\,bw^+ : 3\,v\,bw^+ : 1\,v^+ : 1\,v\,bw$ или 3 + + : 3 *v* + : 1 + *bw* : 1 *v bw*. У мух *v bw* глаза белого цвета, поскольку образование красного и коричневого пигментов у них блокировано.

P: ♀ v/v; $bw+/bw^+$ × ♂ $+/Y$; bw/bw

F_1 ♀ v/v^+; bw/bw^+ × ♂ v/Y; bw/bw^+

F_2: 3 + + : 3 *v* + : 1 + *bw* : 1 *v bw*

Таким образом, количественно расщепление по фенотипу во втором поколении зависит не только от типа взаимодействия, но и от локализации генов в аутосомах и половых хромосомах.

Изучена биохимическая природа взаимодействия этих генов. Известно, что каждый из этапов метаболизма того или иного соединения катализируется ферментами. В свою очередь фермент находится под контролем одного или нескольких генов в зависимости от числа неидентичных субъединиц, входящих в его структуру. В метаболических путях продукт каждой предыдущей ферментативной реакции является субстратом следующей. Так происходит до тех пор, пока не образуется конечный продукт. При этом последовательно активируются гены, кодирующие ферменты, которые необходимы для превращения субстратов в продукты на всех этапах биосинтеза. Биосинтез коричневого пигмента у *Drosophila melanogaster* представляет собой именно такой метаболический путь; различные этапы этого пути блокируются мутациями *v*, *cn*, *st*, *cd*. Мутация гена *vermilion* блокирует превращение триптофана в формилкинуренин вследствие потери активности фермента триптофанпирролазы (рис. 5.5). У мутантов *cinnabar* из-за отсутствия активности кинуренингидроксилазы нарушено превращение кинуренина в 3-оксикинуренин. Мутации *cardinal* и *scarlet* нарушают последний этап биосинтеза оммохромов из 3-оксикинуренина. При этом у мутантов *cardinal* снижена активность феноксазино-синтетазы, а у мутантов *scarlet* нарушено поглощение кинуренина тканями. Носители мутаций, блокирующих синтез коричневого пигмента, но не влияющих на синтез красных пигментов, имеют сходный фенотип: ярко-красную окраску глаз.

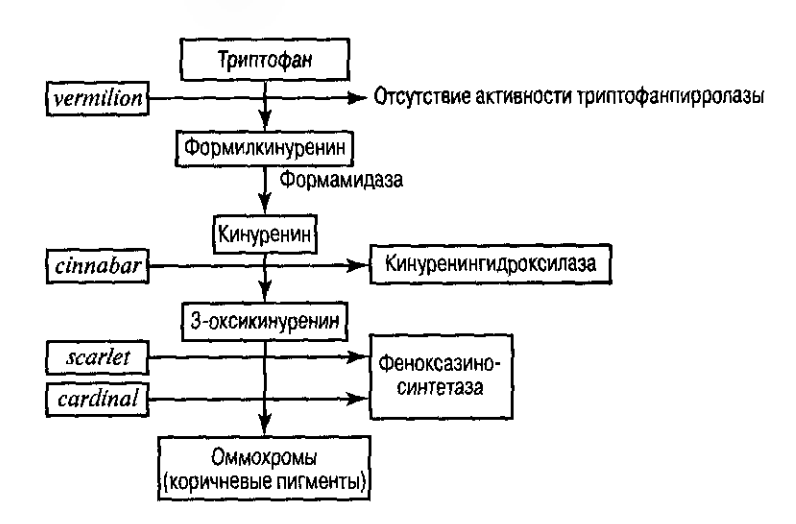


Рис. 5.5. Блокирование генами *v*, *cn*, *st*, *cd* различных этапов биосинтеза коричневого пигмента у дрозофилы

У гомозигот по перечисленным мутациям коричневый пигмент не образуется

Каждый из аутосомных генов, блокирующих один из этапов биосинтеза коричневых пигментов, наследуется по менделевским правилам. Так, при скрещивании мутантов $bw \times bw^+$; $st \times st^+$; $cd \times cd^+$ в первом поколении у гетерозигот bw/bw^+, st/st^+, cd/cd^+ доминируют нормальные аллели, а во втором поколении во всех скрещиваниях наблюдается расщепление 3:1. С одной стороны, такой тип наследования признака, судя по зависимости признака от определенного гена, является моногенным. Но, с другой стороны, в биохимической цепи синтеза коричневого пигмента каждый следующий этап синтеза зависит от предыдущего, находящегося под контролем другого гена. Так кинуренингидроксилаза (первичный продукт гена *cinnabar*) обеспечивает синтез 3-оксикинуренина из кинуренина, но кинуренин образуется из предыдущего соединения (формилкинуренина) при действии фермента триптофанпирролазы, кодируемого другим геном – *vermilion*. Поэтому образование коричневого пигмента зависит от согласованного действия всех нормальных аллелей генов: v^+, cn^+, st^+ и cd^+. На этом примере видно, что моногенность наследования признаков отнюдь не означает абсолютную независимость действия генов, которые кодируют ферменты, участвующие в последовательных реакциях одного метаболического пути.

В приведенном примере мутации *v*, *cn*, *st*, *cd*, с одной стороны, и мутация *bw* – с другой, блокировали пути биосинтеза различных пигментов. Вместе с тем у эукариот известны примеры взаимосвязанных метаболических путей, когда одна мутация может одновременно блокировать разные цепи биохимических процессов.

Так в экспериментах на *Drosophila melanogaster* была показана биохимическая природа взаимодействия двух мутаций *Pgd* (*Phosphogluconate dehydrogenase*) и *Zw* (*Zwischenferment*), локализованных в Х-хромосоме. Мутации гена *Pgd*, (6ФГД) блокируют превращение 6-фосфоглюконата в рибулозо-5-фосфат вследствие снижения

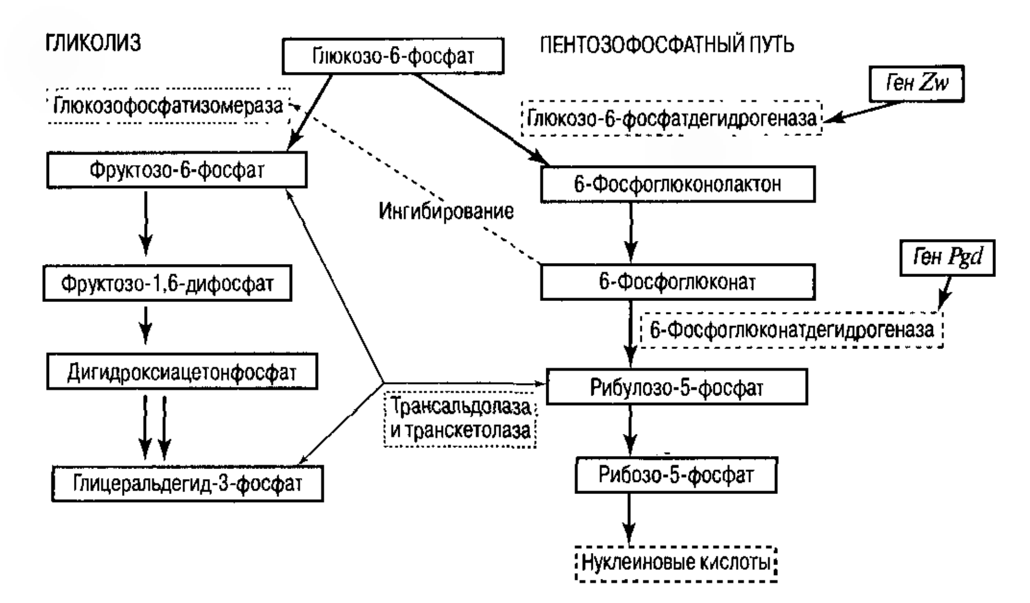


Рис. 5.6. Взаимосвязь метаболических путей гликолиза и пентозного цикла в норме и при супрессии. (Из: Герасимова, 1981)

активности фермента 6-фосфоглюконатдегидрогеназы. 6-Фосфоглюконат (промежуточный продукт пентозного пути) ингибирует фермент гликолиза – глюкозофосфатизомеразу, превращающую глюкозо-6-фосфат во фруктозо-6-фосфат (рис. 5.6). Блокирование двух путей окисления глюкозы гликолиза и пентозо-фосфатного цикла является летальным, поскольку в отсутствие гликолиза организм не обеспечен достаточным количеством молекул АТР, а пентозо-фосфатный путь необходим для синтеза молекул NADPH и нуклеиновых кислот.

Супрессорами для всех *Pgd*-леталей служат мутации в гене *Zw*. При наличии мутаций в гене *Zw* снижается активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФД); в результате глюкозо-6-фосфат может быть использован в гликолизе. В этом случае 6-фосфоглюконат не ингибирует гликолиз, а выступает в роли субстрата для образования пентоз. Мутации гена *Zw* восстанавливают жизнеспособность мух без восстановления функции локуса *Pgd* (см. рис. 5.6.).

5.2.4. ГЕНЫ-МОДИФИКАТОРЫ

Наряду с генами «основного» действия, на развитие любого признака оказывают влияние и другие гены, как правило, не имеющие собственного фенотипического проявления. **Энхансеры** усиливают, а **супрессоры** (ингибиторы) ослабляют проявление основных, главных генов. Такие неаллельные гены, усиливающие или ослабляющие действие главного гена, называются **генами-модификаторами.** Многие гены в организме в одно и то же время могут быть генами «главного действия» по одним признакам и генами-модификаторами по другим. Это частный случай плейотропно-

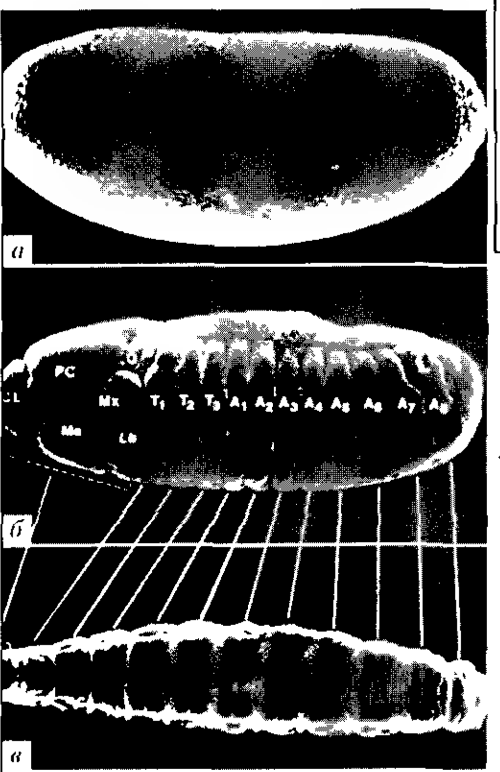
го (множественного) действия генов, когда один ген влияет одновременно на несколько признаков организма.

На дрозофиле было показано, что гены-модификаторы обладают следующими свойствами:

- могут быть локализованы либо в той же хромосоме, что и основной ген, либо в другой хромосоме;
- могут оказывать плейотропный эффект на такие количественные признаки, как жизнеспособность и плодовитость;
- один и тот же ген-модификатор может ослаблять действие одних и усиливать действие других генов.

5.2.5. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНОВ, ФУНКЦИОНИРУЮЩИХ В РАННЕМ ЭМБРИОНАЛЬНОМ РАЗВИТИИ

Дрозофила – один из модельных объектов, который используется для изучения взаимодействия генов в раннем эмбриональном развитии. Личинки и взрослые мухи дрозофилы (имаго) имеют сегментарное строение (рис. 5.7).



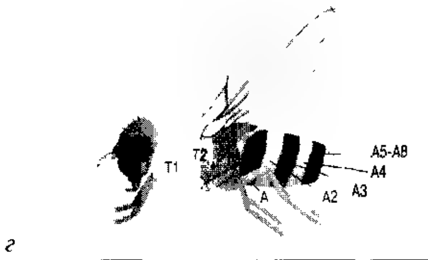
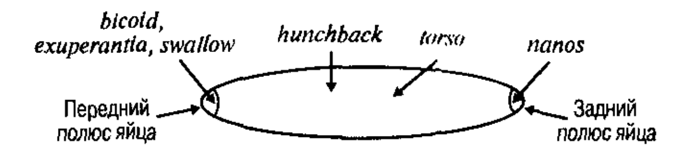
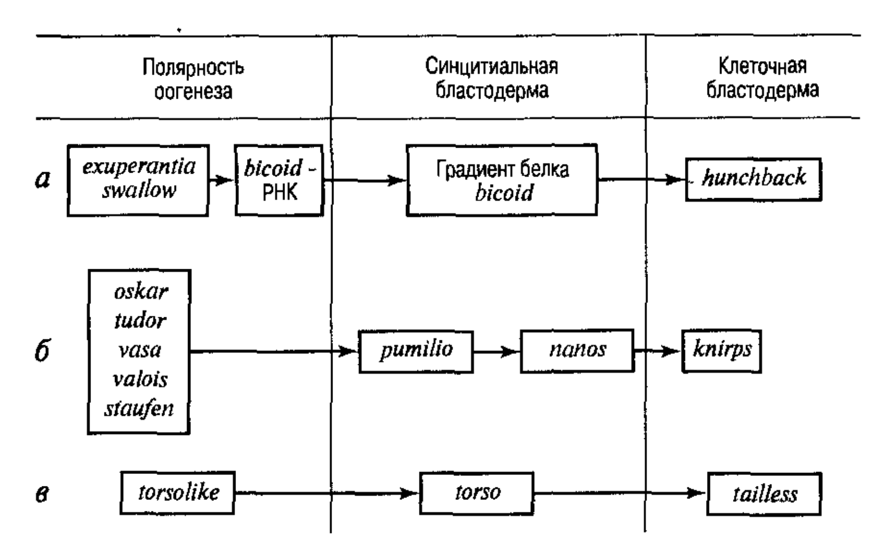


Рис. 5.7. Сегментация тела у *Drosophila melanogaster* (фотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа). (Из: Griffiths, 2000)

а – 3-часовой эмбрион; б – 10-часовой эмбрион, в – вылупившияся из яйца личинка, г – взрослая муха. *Линии показывают* идентичность сегментов 10-часового эмбриона и личинки. Сегменты головы выделены скобкой; T1–T3 – сегменты торакса, A1 – A8 – сегменты брюшка



ис. 5.8. Активность взаимодействующих генов с материнским эффектом – первый этап гановления пространственной организации у дрозофилы. (По: Griffiths et al., 2000)



'ис. 5.9. Последовательная активация генов с материнским эффектом, контролирующих передне-заднюю полярность зародыша у дрозофилы. (По: Гилберт, 1995)

– организация переднего отдела; б – организация заднего отдела, в – терминалии

Эмбриогенез у дрозофилы осуществляется под контролем нескольких групп взаимодействующих генов (см, гл. 16). Здесь мы рассмотрим те из них, которые ведают детерминацией полярных осей и обладают материнским эффектом. Материнский эффект заключается во влиянии генотипа матери на формирование признака у потомства, передаваемое через накопленные в цитоплазме яйцеклеток первичные продукты материнских генов. Так, в оогенезе у дрозофилы происходит накопление и градиентное распределение в созревающем яйце сначала мРНК, а затем белков, кодируемых этими генами. При трансляции мРНК гена *bicoid* во время ранних делений дробления синтезируется белок, который формирует градиент с наибольшей концентрацией в переднем полюсе яйца. Два других белка, кодируемых генами *exuperantia* и *swallow*, обеспечивают распределение продукта гена *bicoid* в переднем конце яйца (рис. 5.8.). При отсутствии продуктов этих генов градиент белка гена *bicoid* распространяется ближе к заднему полюсу. У мутантов *bicoid* отсутствуют голова и грудь, а на их месте образуются терминальные структуры личинки. Ген *bicoid* взаимодействует также с геном *hunchback*, *hb*, – одним из ранних генов, активирующихся в зиготе (рис. 5.9, *а*). У мутантов по гену *hb* отсутствуют ротовые части и структуры груди.

В задней части зародыша функционирует ген *nanos* и другие гены, продукты которых необходимы для развития брюшка мухи (рис. 5.9, *б*). Ген *nanos* супрессирует действие гена *hunchback* в задней части зародыша. Доставка продукта гена *nanos* из заднего полюса в область брюшных сегментов осуществляется с помощью продуктов гена *pumilio*. Существуют еще гены, которые определяют границы между сегментированными и несегментированными частями тела. Одним из таких генов является ген *torso*, мутации которого приводят к отсутствию у зародыша несегментированных терминальных структур (акрона в передней части зародыша и тельсона – в задней). Продукт этого гена синтезируется во всем зародыше, но активируется только на его полюсах . Предполагают, что продукт гена *torso* взаимодействует с геном *tailess* и геном *huckebein* при формировании терминальных структур зародыша (рис. 5.9, *в*).

Таким образом, пространственное распределение белков в цитоплазме яйца и зародыша дрозофилы основано на взаимодействии (активации и репрессии) специфических генов.

5.2.6. ПОЛИГЕННОЕ НАСЛЕДОВАНИЕ КАЧЕСТВЕННЫХ И КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ

Кумулятивная полимерия. Значительная часть признаков у эукариот, наследуемых полигенно, находится под контролем не двух-трех, а большего числа генов (их количество пока еще трудно определить). При моногенном типе наследования в моногибридном скрещивании один ген проявляется в двух альтернативных состояниях без переходных форм. Такие признаки относятся к **качественным**, при их анализе, как правило, не проводится никаких измерений. При неаллельном взаимодействии двух несцепленных генов даже при сохранении менделевского отношения 9:3:3:1 фенотип первого поколения гибридов зависит от действия обоих генов. Однако наследование качественных признаков может определяться взаимодействием трех и более генов. При этом каждый из этих генов имеет свою долю влияния на развитие признака. Примером может служить наследование красной и белой окраски зерен пшеницы в опытах шведского генетика Нильсона-Эле. Результаты этих опытов были опубликованы в 1909 г.

При скрещивании сорта пшеницы, зерна которой имели темно-красную окраску, с сортом, имеющим белые зерна, гибриды первого поколения имели красную окраску более светлых тонов. Во втором поколении получилось такое соотношение по фенотипу: на 63 окрашенных зерна с различными оттенками красного цвета приходилась 1 белое зерно (неокрашенное). Эти результаты были объяснены Нильсоном-Эле следующим образом. Темно-красная окраска зерен пшеницы обусловлена действием трех пар доминантных генов, а белая – трех пар рецессивных, при этом по мере увеличения числа доминантных генов окраска становится более интенсивной. Обозначим доминантные аллели трех генов, локализованных в разных хромосомах, прописными буквами A^1 A^2 A^3 а рецессивные – строчными a^1 a^2 a^3, тогда генотипы исходных форм будут: A^1A^1 A^2A^2 $A^3A^3 \times a^1a^1$ a^2a^2 a^3a^3.

Гаметы	$A^1A^2A^3$	$A^1A^2a^1$	$a^1A^2A^3$	$A^1a^2A^3$	$A^1a^2a^3$	$a^1A^2a^3$	$a^1a^2A^3$	$a^1a^2a^3$
$A^1A^2A^3$	6	5	5	5	4	4	4	3
$A^1A^2a^3$	5	4	4	4	3	3	3	2
$a^1A^2A^3$	5	4	4	4	3	3	3	2
$A^1a^2A^3$	5	4	4	4	3	3	3	2
$A^1a^2a^3$	4	3	3	3	2	2	2	1
$a^1A^2a^3$	4	3	3	3	2	2	2	1
$a^1a^2A^3$	4	3	3	3	2	2	2	1
$a^1a^2a^3$	3	2	2	2	1	1	1	0

Рис. 5.10. Определение частот доминантных генов в скрещивании краснозерных и белозерных сортов пшеницы

Окраска зерен у гибридов первого поколения A^1a^1 A^2a^2 A^3a^3 при наличии трех доминантных аллелей будет промежуточной светло-красной. При скрещивании гибридов первого поколения A^1a^1 A^2a^2 $A^3a^3 \times A^1a^1$ A^2a^2 A^3a^3 у каждого из гибридов образуется по 8 типов гамет, поэтому во втором поколении ожидается расщепление в 64-х долях (8 × 8). Среди 63/64 растений с окрашенными зернами интенсивность окраски усиливается по мере увеличения числа доминантных аллелей различных генов в генотипе. Видимо, каждый доминантный ген способствует увеличению количества синтезированного пигмента, и в этом смысле такой признак можно отнести к количественным. Тип аддитивного действия генов, каждый из которых оказывает свою, часто небольшую, долю влияния на признак, называется **кумулятивной полимерией**.

Используя решетку Пеннета, можно подсчитать частоты доминантных генов среди генотипов второго поколения. Для этого в каждой из 64 клеток вместо генотипа записывается число присутствующих в нем доминантных аллелей (рис. 5.10). Определив частоты доминантных аллелей, можно убедиться, что генотипы с числом доминантных генов 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0 встречаются 1, 6, 15, 20, 15, 6, 1 раз соответственно. Эти данные представлены в виде графика на рис. 5.11. На горизонтальной оси указано число доминантных генов в генотипе, а на вертикальной частоты их встречаемости. С увеличением числа генов, определяющих один признак, этот график приближается к идеальному нормальному распределению. Такого типа графики характерны для **количественных признаков**, таких как рост, вес, длительность жизни, яйценоскость и других признаков, показатели которых можно измерить.

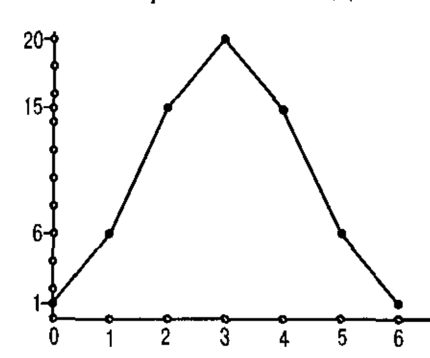


Рис. 5.11. Частоты встречаемости доминантных генов во втором поколении от скрещивания гетерозигот $A^1a^1A^2a^2A^3a^3$ × $A^1a^1A^2a^2A^3a^3$ у пшеницы

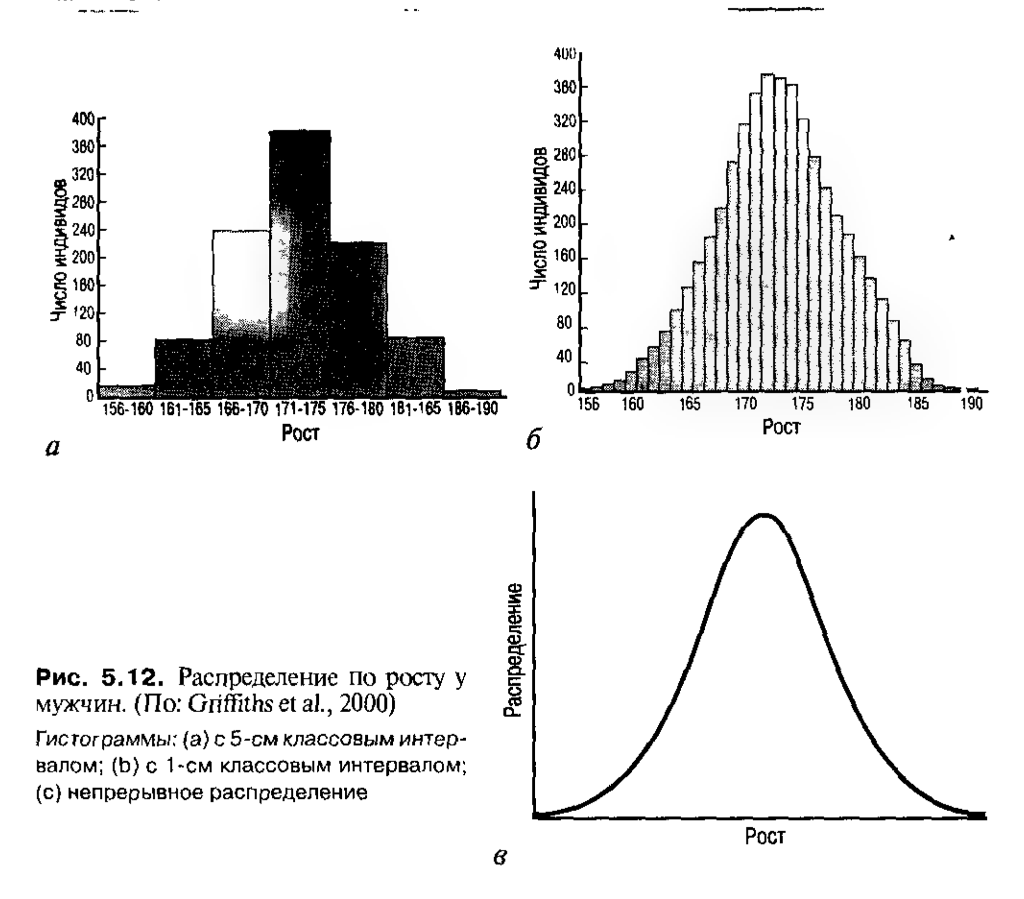


Рис. 5.12. Распределение по росту у мужчин. (*По*: *Griffiths* et al., 2000)

Гистограммы: (а) с 5-см классовым интервалом; (b) с 1-см классовым интервалом; (с) непрерывное распределение

К количественным относятся признаки, варьирующие более или менее непрерывно от одной особи к другой, что позволяет распределить особей по классам в соответствии со степенью выраженности признака. На рис. 5.12 приведен пример распределения по росту у мужчин. Эта выборка разделена на 7 классов с 5 см-интервалом. Мужчины со средним ростом (171–175 см) составляют бóльшую часть выборки. С наименьшей частотой встречаются мужчины, которые включены в класс с ростом 156–160 см и 186–190 см. С увеличением выборки и с уменьшением классового интервала график может приблизиться к нормальному распределению по росту.

Фенотипическая изменчивость без разрывов в проявлении, представленная на графике нормального распределения признака, называется *непрерывной*. Непрерывная изменчивость количественных признаков зависит от двух причин: 1) от генетического расщепления по большому числу генов, 2) от влияния среды, как причины модификационной изменчивости.

Впервые датский генетик Иогансен показал, что непрерывная изменчивость такого количественного признака как масса бобов фасоли *Phaseolus vulgaris* зависит как от генетических, так и средовых факторов. Путем инбридинга в течение ряда поколений он вывел несколько чистых (гомозиготных) линий, различающихся по средней массе бобов. Например, средняя масса бобов в линии 1 была 642 мг, в линии

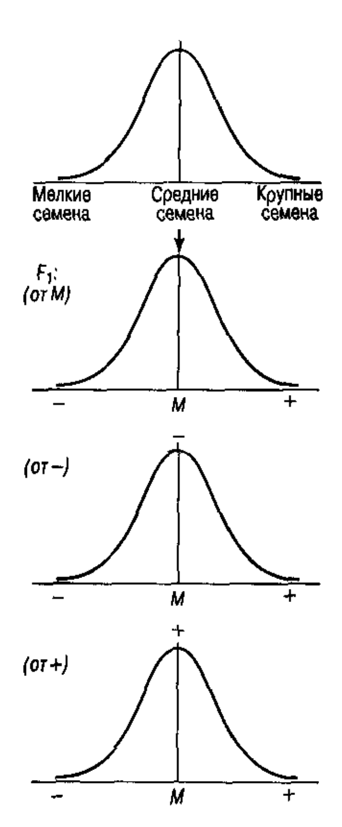


Рис. 5.13. Схема отбора мелких, средних и крупных семян в одной из чистых линий в опыте В. Иоганнсена на примере одного поколения. (По: Дубинин, 1986)

Изменчивость в чистых линиях носит модификационный характер, поэтому отбор и создание новых линий, достоверно отличающихся по весу семян, в генетически гомозиготных линиях, оказался невозможен

13 – 454 мг, в линии 19 – 351 мг. Далее Иогансен вел отбор крупных и мелких бобов в каждой линии с 1902 по 1907 г. Вне зависимости от массы родительских семян средняя масса бобов после 6 лет отбора была такой же, как и в исходной линии (рис. 5.13). Так в линии № 13 при массе родительских семян от 275 мг до 575 мг средняя масса семян в потомстве сохранилась на том же уровне ±450 мг (табл. 5.1). При этом в каждой линии масса бобов варьировала от минимальных до максимальных значений, а наиболее многочисленным был класс со средней массой, что характерно для количественных признаков (см. рис. 5.13). Отбор в чистых линиях оказался невозможен.

Еще один пример. В 1977 г. Д.С. Билева, Л.Н. Зимина, А.А. Малиновский изучали влияние генотипа и среды на продолжительность жизни двук инбредных линий *Drosophila melanogaster*. Путем инбридинга и отбора были выведены две линии № 5 и № 3, четко различающиеся по длительности жизни. Продолжительность жизни определялась на трех вариантах корма: полноценном (дрожжи, манная крупа, сахар, агар-агар), обедненном (манная крупа, сахар, агар-агар) и сахарном (сахар, агар-агар). Обеднение состава корма приводило к уменьшению длительности жизни. Продолжительность жизни самок 5-й линии на сахарном корме (в днях) снизилась с 58±2,1 до 27,2±1,8, а самцов с 63,7±2,9 до 34,8±1,5, т.е. оказалась примерно в 2 раза меньше, чем на полноценном корме. Такая же закономерность была характерна и для самок и самцов 3-й линии. Длительность жизни самок этой линии снизилась с 50,7±1,9 до 24,3±1,2, а самцов с 32,9±2,9 до 21,6±1,5 дня. При этом гистограмма, отражающая изменчивость по данному признаку на полноценном корме, близка к гистограмме представленной на рис. 5,12, *а*, а на обедненном и сахарном наблюдается ассиметричное распределение со сдвигом средней величины в сторону уменьшения длительности жизни.

Некумулятивная полимерия. Наряду с кумулятивной (аддитивной) полимерией известны случаи наследования по типу некумулятивной (неаддитивной) полимерии, когда характер проявления признака не меняется в зависимости от числа доминантных полимерных генов. Так у кур оперенность ног определяется доминантными аллелями двух генов A^1 и A^2:

Таблица 5.1. **Число бобов различной массы в потомстве семян с разной массой**

Масса родительских семян, мг	Число семян в потомстве, имеющих следующую массу, мг									Средняя масса семян в потомстве, мг
	225	275	325	375	425	475	525	575	625	
275		1	5	6	11	4	8	5		445
375	1	2	6	27	43	45	27	11	2	453
475		5	9	18	28	19	21	3		434
575		1	7	17	16	26	17	8	3	458

Класс семян 225 мг включает семена, имеющие массу между 200 и 250 мг, класс семян 275 мг включает семена, имеющие массу между 200 и 300 мг, и т.д.

P $A^1A^1\ A^2A^2$ × $a^1a^1\ a^2a^2$
оперенная неоперенная

F_1 $A^1a^1\ A^2a^2$
оперенные

F_2 9 $A^1_A^2_$; 3 $A^1_\ a^2a^2$; 3 $a^1a1\ A2_$; 1 $a^1a^1\ a^2a_2$
оперенные (15) неоперенные (1)

В F_2 среди 15/16 гибридов с оперенными ногами есть такие, которые имеют четыре доминантных аллеля ($A^1A^1\ A^2A^2$), три ($A^1A^1\ A^2a^2$), два ($A^1a^1\ A^2a^2$) или всего один ($A^1a^1\ a^2a^2$), характер оперенности ног в этих случаях один и тот же.

Главные гены в системе полигенов. Среди генов, влияющих на количественный признак, может оказаться «сильный» или главный ген, и более «слабые» гены. Действие главного гена иногда настолько существеннее действия других генов, что признак, кодируемый им, наследуется по менделевским законам. Изменчивость одного и того же признака может находиться под контролем как одного главного гена, так и полигенов. Например, карликовость у человека в случае ахондроплазии обусловлена специфическим главным геном, в то время как изменчивость по росту в нормальной популяции индивидов является примером полигенной изменчивости. Гены, действие которых заметно сильнее действия других генов на этот признак, можно изучать по отдельности от действия других генов. С другой стороны, один и тот же ген вследствие плейотропного действия, может оказывать сильное влияние на один признак и менее значительное на другой признак. К тому же к главным генам могут быть отнесены те, которые определяют признаки, наследуемые по законам Менделя, без их отношения к системе полигенов. Подразделение генов на главные и неглавные не всегда обосновано, хотя бесспорно, что их роль в определении признака может быть различна.

Широко распространенные болезни человека, например, артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, бронхиальная астма, язвенная болезнь желудка, наследуются полигенно. При этом тяжесть заболевания зависит не только от совокупного действия множества генов, но и от провоцирующих средовых факторов. Современным представлениям о генетических механизмах такого типа болезней, называемых мультифакториальными, посвящена гл. 24.

6 ГЕНОТИП И ФЕНОТИП. МОДИФИКАЦИИ И НОРМА РЕАКЦИИ

В начале XX века наиболее вдумчивые биологи-гибридизаторы У. Бэтсон в Англии и В. Иогансен в Дании осознали, что простые менделевские численные отношения особей с альтернативными проявлениями признаков - результат сложных клеточных и биохимических процессов. Именно поэтому уже в 1909 г. В. Иогансен предложил различать понятия **генотип** и **фенотип**, понимая под первым совокупность генетических задатков (генов) во всех хромосомах организма, а под вторым — совокупность наблюдаемых структурных и функциональных признаков организма, детерминируемых его генотипом. Позже немецким зоологом В. Хэкером изучение соотношений между генотипами и фенотипами организмов было названо **феногенетикой.**

Как известно, главный предмет изучения генетики (в том числе и феногенетики) — удивительная способность живых систем к самовоспроизведению, сопровождающемуся неизбежной изменчивостью как наследственной, так и благоприобретенной природы. Причем, при размножении организмов любой степени сложности поколение от поколения отделено стадией оплодотворенной яйцеклетки — зиготы. Следовательно, именно в зиготе и должна содержаться в закодированном виде вся наследственная информация, передаваемая от поколения к поколению.

Общие принципы строения генетического кода были раскрыты во второй половине XX века, а для некоторых видов, включая человека, были определены полные нуклеотидные последовательности всех хромосом. Гораздо меньше известно о механизмах реализации генетической информации, о становлении морфологических, физиологических, этологических и др. признаков.

Прежде чем приступить к анализу взаимодействия генотипа и фенотипа, необходимо ответить на вопрос, чем отличаются наследственные и ненаследственные признаки. Обдумывая эту проблему, легко придти к выводу, что, в сущности, ненаследственных признаков нет. Хорошо известна формула академика И.И. Шмальгаузена: «Наследуются не признаки, как таковые, а нормы их реакции на изменения условий существования организмов». Поясним сказанное примером. Если воспитывать гусениц некоторых бабочек при разных температурах, то из гусениц, выращенных при низких температурах, получаются темные формы бабочек, а при высоких — светлые. Это признак ненаследственный, потому что при перенесении тех и других гусениц в нормальные (средние) температурные условия окраска всех бабочек будет одинаковой, промежуточной, какой она и должна быть при этих температурах. Но вот сам факт, что бабочки некоторых видов отвечают на понижение температуры потемнением окраски, а на повышение — посветлением, есть присущее им наследственное свойство, предусмотренное их генетическим кодом. Пигментообразование у других организмов иначе реагирует на изменение температуры, либо вовсе не реагирует.

Следовательно, у них наследственным признаком является другая норма реакции. В сущности, ненаследственные изменения – модификации также являются отображением какого-то наследственного свойства данной формы организмов. Понятие нормы реакции широко используется в медицинской генетике при описании изменчивости проявления наследственных болезней человека.

Еще один пример. В 1920-е годы у *Drosophila funebris* была выделена мутация, обусловливающая нерасправление крыльев у мух после их вылупления из куколок. Как известно крылья насекомых состоят из двух хитиновых пластинок, между которыми проходят жилки, являющиеся своеобразными кровеносными сосудами. У куколок крылья сложены определенным образом, а после вылупления имаго в жилки их крыльев нагнетается кровь, крылья расправляются, а основное их вещество (хитин) – отвердевает. Сейчас мутации, ведущие к нерасправлению крыльев известны у целого ряда насекомых. Но такая аномалия может быть и ненаследственной. В слишком сухих или слишком влажных культурах дрозофилы у некоторых особей затвердение хитина опережает нагнетание крови в жилки, и в результате крылья не расправляются. При наблюдениях над большим числом индивидов из генетически различных штаммов оказалось, что имеется статистически вполне достоверное различие между числом таких «аварий» вылупления у различных штаммов, как содержащих крыловые мутации, так и не содержащих таковых. Причем эти «аварии» сами по себе не наследуются, поскольку свойственная данному штамму частота нерасправления крылышек в заданных условиях не изменяется независимо от того, брать ли для дальнейшего размножения особи с полностью расправленными или вовсе не расправленными крыльями. Таким образом, само нерасправление крылышек не наследуется, хотя предрасположение к такому нерасправлению наследственно, поскольку генетически различные штаммы характеризуются определенной частотой нерасправлений. Сходная ситуация складывается и при наследовании и проявлении неполно манифестирующих наследственных болезней человека.

Приведенные примеры показывают сложность взаимоотношений между генами и признаками.

В дальнейшем будет показано, что и у классических наследственных изменений, мутаций, часто наблюдается широкий диапазон модификационной изменчивости, определяемой взаимоотношениями генотипа с комплексом факторов «генотипической», «внутренней» и «внешней» среды организма; подробнее о таком дифференцированном понимании среды будет сказано ниже. Сложность взаимоотношений между молекулярным генетическим кодом и фенотипом давно уже ясна генетикам, и лишь поверхностные критики могут приписывать им упрощенный взгляд на проблему «ген – признак». На огромном материале хромосомных аномалий, особенно делеций, у животных, растений и человека, показано, что выпадение какого-либо гена из генотипа ведет не просто к выпадению соответствующего признака, а, как правило, к тяжелым общим морбидным, а то и летальным последствиям. Таким образом, в индивидуальном развитии организма генотип функционирует не как аддитивная сумма генов, определяющих соответствующую сумму признаков. А как целостная система, в которой каждый ген влияет на многие признаки, а каждый признак определяется многими генами.

6.1. ВАРИАЦИЯ ПРОЯВЛЕНИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ В ИНДИВИДУАЛЬНОМ РАЗВИТИИ ОРГАНИЗМОВ

Вариация наследственных признаков организмов прежде рассматривалась, как одно из основных направлений феногенетики, что в современных терминах ближе всего к «функциональной геномике» – крайне комплексной и еще не устоявшейся дисциплине, отдельные разделы которой пока слабо связаны друг с другом.

При исходной формулировке феногенетики почти сто лет назад зоологом В. Хэкером ставилась задача отыскания в онтогенезе организмов таких фаз (он их назвал фенокритическими), начиная с которых мутантные формы отличаются от исходных. За 1920-е–30-е годы много таких данных было накоплено самим Хэкером и его многочисленными последователями. Так, норвежский зоолог К. Бонневи собрала обширный материал по эмбриологии наследственных врожденных пороков человека. Путем морфофизиологического анализа она смогла вычленить наследственные нарушения от случайных, вызванных посторонними причинами. Большой материал по фенокритическим фазам у растений собрали Баур в Германии и Синнот в Америке.

В 1930-е гг. на дрозофиле была разработана методика трансплантации имагинальных дисков, т.е. эмбриональных закладок имагинальных («взрослых») органов. Изучая последствия трансплантаций целых дисков или их определенных частей, взятых в разном возрасте, генетики получили возможность судить о механизмах становления признаков. Особенно много экспериментов было выполнено по трансплантации имагинальных дисков глаз. Оказалось, что при пересадке имагинального диска глаза одной личинки в абдоминальную полость другой из имплантата развивается полноценный пигментированный фасеточный глаз, только оставшийся в форме невывернутой сферы. При аккуратной работе в брюшную полость одной личинки удавалось имплантировать до пяти чужеродных имагинальных дисков и получить их полное развитие. Этому методу посвящено большое число статей. Это, в первую очередь, первоклассные работы Б.С. Эфрусси, Дж.У. Бидла, Н.Н. Медведева, Н.В. Тимофеева-Ресовского и его германской и отечественной (Е.К. Гинтер, М.П. Абатурова, В.А. Мглинец и др.) школ, ряда ведущих современных ученых В.А. Гвоздев, Л.И. Корочкин, В.Г. Митрофанов и др).

Наиболее плодотворным оказался этот подход при изучении соматических мутаций. Так, у дрозофилы при рентгеновском облучении разновозрастных личинок Дж. Патерсон и Н.В. Тимофеев-Ресовский обнаружили вкрапления белых фасеток или их групп на фоне нормально красной окраски глаз. С увеличением возраста облучаемых личинок размер таких мозаичных пятен прогрессивно уменьшался. Причем динамика уменьшения среднего размера пятен была настолько закономерной, что авторы смогли вычислить по ней скорость развития глаз. Аналогичная картина

наблюдалась и для ряда других мутантных окрасок глаз. В целом все явление было истолковано как результат возникновения мутаций в соматических клетках при облучении.

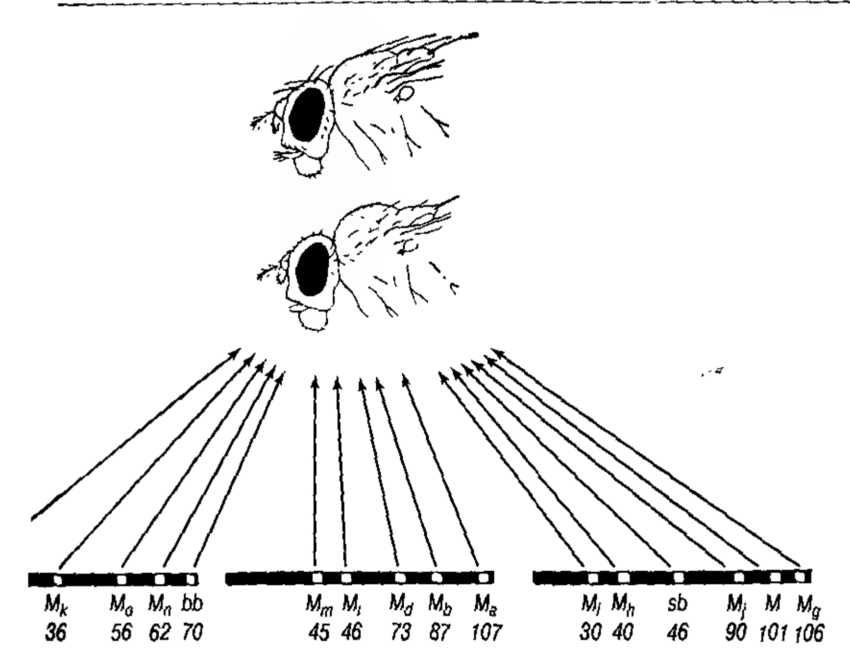
Среди соматических мутаций у дрозофилы никому не удалось выявить мутацию *vermilion* (яркие глаза). Большинство экспериментаторов полагали, что такая мутация может происходить только в гаметах. Иначе объяснял это явление один из ведущих сотрудников группы Т.Х. Моргана – А.Х. Стертевант. По его мнению, хромосомы вряд ли могут быть мутабильными в одни периоды онтогенеза и немутабильными в другие. Различие в мутабильности в разных клетках и в разные периоды кроется не в хромосомах, а в признаках: проявление одних (он назвал их *независимыми*) осуществляется в тех самых клетках, где произошли мутации и не распространяется на соседние клетки, а проявление других (*зависимые* признаки) управляется гуморально, дистанционно. Соответствующие метаболиты получили название **геногормонов.** Общий термин «геногормоны» в литературе не удержался, а многочисленные, выявленные позже химические регуляторы активности генов, получили собственные наименования в соответствии со своим составом и свойствами.

Верная, по сути, гипотеза А. Стертеванта была вскоре подтверждена Б.С. Эфрусси и Дж. У. Бидлом с помощью трансплантации имагинальных дисков глаз дрозофилы. Эти авторы обнаружили, что при трансплантации имагинальных дисков нормальных глаз личинкам линии *vermilion* имплантированные диски развиваются в нормально окрашенные глаза, а при пересадке дисков vermilion нормальным личинкам из имплантированных дисков развиваются глаза нормальной окраски, а не *vermilion*. Более того, если в личинку *vermilion* имплантировать 4-5 нормальных дисков, то и окраска собственных глаз реципиента нормализуется, по-видимому, под влиянием гуморальных гормоноподобных факторов, выделяемых имплантированными дисками. Позже наблюдения Эфрусси и Бидла были расширены для различных насекомых, что положило начало развитию биохимической генетики. Более подробно эти вопросы рассмотрены в других разделах книги применительно к молекулярной генетике человека.

Сложность взаимоотношений между генами и контролируемыми ими варьирующими наследственными признаками наглядно иллюстрируют два хорошо известных факта: существование гетерогенных групп и плейотропии.

Гетерогенными группами, по предложению Н.В. Тимофеева-Ресовского, с середины 1930-х гг. стали называть группы генов, дающих весьма сходное внешнее проявление, но локализованных в разных хромосомах или разных локусах, как, например, группа генов *minute*, обусловливающих редукцию щетинок у дрозофилы (рис. 6.1). Это явление широко распространено в живой природе, включая человека. Правда, в генетической литературе для его обозначения обычно используют не термин Н.В. Тимофеева-Ресовского «гетерогенные группы», а более поздний (середины 40-х годов XX века), предложенный немецким генетиком Х. Нахтсхаймом – «**генокопии**», в дополнение к которому позже был введен термин «**фенокопии**».

Другим также широко распространенным и давно известным (L. Plate, 1910) и у растений, и у животных, и у человека примером сложности взаимоотношений генов и признаков служит «плейотропия» – феномен множественного проявления отдельных мутаций, нередко на разных частях тела. Такая полисимптоматичность харак-



Гетерогенная группа minute у *Drosophila melanogaster*. (Из: Тимофеев-Ресовский 1966)

удь мухи с щетинками нормальной длины (вверху); голова и грудь мухи с укорочен-
ками (посредине); схематическое изображение трех хромосом дрозофилы (внизу).
юкусы, мутации в которых дают один и тот же фенотипический эффект – укорочен-
и

ли большинства наследственных болезней человека, рассматриваемых как
ные состояния (рис. 6.2).

ютренные выше феномены проявления генов – гетерогенные группы (ге-
) и плейотропия – убедительно показывают несостоятельность простой ли-
схемы «один ген – один фен» на уровне конечных морфофизиологических
ов. О подобном практически однозначном соответствии следует говорить
а уровне «один ген – один фермент» (Бидл), или даже – «один ген – одна
тидная цепь» (и то, вынося за скобки целый ряд исключений из этого обще-
ла).

ду с вовлечением в морфофизиологические комплексы проявлений отдель-
ов разных компонентов, вариация проявления генов может выражаться и ко-
енно – в разных степенях проявления одних и тех же признаков. Так, на
изображены проявления двух «глазных» мутаций у дрозофилы. У мух дикого
за состоят из ≈750 фасеток, у мух линии *Bar* они редуцированы до 70–75 фа-
В культурах же *eyeless* размер глаз широко варьирует от едва заметного умень-
до полного их отсутствия. Такая же широкая вариация наблюдается и у потом-
мух как с сильной, так и со слабой редукцией размеров глаз. Таким образом,
показывают, что фенотипическое проявление мутаций может

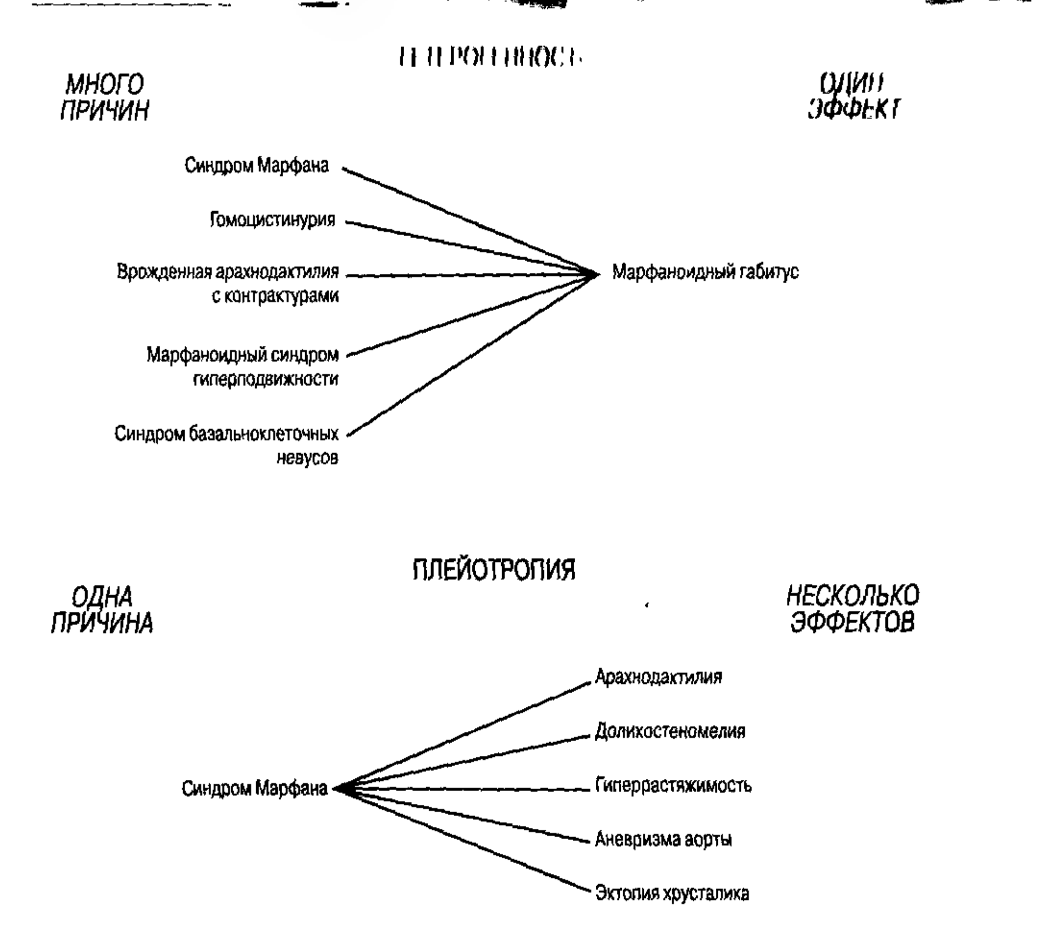
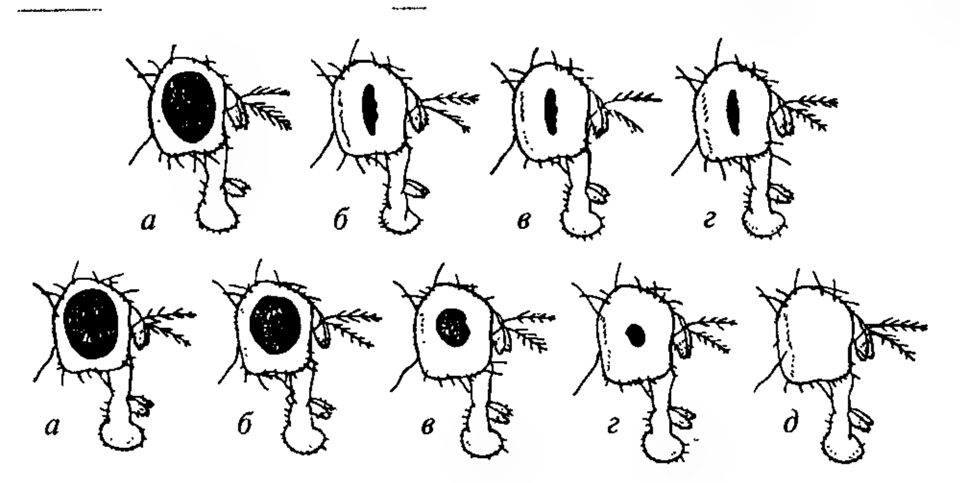


Рис. 6.2. Гетерогенность и плейотропия в проявлении наследственных признаков. (По: Cohen, 1982)

Картина фенотипической изменчивости генов была бы неполной без упоминания о вариации проявления в сериях множественных аллелей. Один из примеров такой вариации демонстрирует серия аллелей *white* у *Drosophila melanogaster*. В этой серии уже открыто несколько десятков разных аллелей, каждый из которых обусловливает свою окраску глаз – от вишневой через убывающие по силе оттенки красного цвета, до желтых, бледно-желтых и чисто белых.

Сказанное выше о фенотипической вариации проявления генов характеризует скорее внешнюю сторону этого процесса. Несколько ближе к физиологическим механизмам действия генов стоит вариация их проявления в связи с количеством аллелей, наличных в генотипе. Так, К. Штерн получил у дрозофилы измененные Х-хромосомы, каждая из которых несла не один, как в норме, а от двух до пяти аллелей *bobbed* (укороченные щетинки). С увеличением числа таких аллелей размер щетинок увеличивался почти до нормального. Это явление получило название **гипоморфизма**.



ис. 6.3. Фенотипическая изменчивость проявления генов. (Из: Тимофеев-Ресовский и ванов, 1966)

верху: мутация Bar у Drosophila melanogaster: а – нормальный глаз, б–г – редуцированные лаза, проявление мутантного гена достаточно стабильно. Внизу: мутация eyeless у melanogaster; а – нормальный глаз, б– д – различная степень редукции глаза у мух, гомози-этных по eyeless.

Іример иных взаимоотношений демонстрируют аллели локуса *ebony* (черная окраска тела дрозофилы): действие каждого мутантного аллеля этого локуса примерно равновешивает действие одного нормального аллеля, т.е. они действуют с одинаковой силой, но в противоположных направлениях. Такое явление называют **антиюрфизмом**. Если проявление мутантного аллеля не зависит от числа нормальных ллелей в генотипе, говорят о неоморфизме. Примером неоморфизма может служить мутация *Hairy wing* (волосатость крыльев) у дрозофилы.

Рассмотренные типы взаимоотношений между аллелями иллюстрирует нижеледующая схема:

Гипоморфизм (*bobbed*)
$1bb < 2bb < 3bb < 1bb^{+}$
$5bb \sim 1bb^{+}$

Антиморфизм (*ebony*)
$3e > 2e > 1e/1e^{+} < 2e^{+} < 3e^{+}$
$1e^{+} + 1e \sim 2e^{+} + 2e$

Неоморфизм (*Hairy wing*)
$1Hw < 2Hw < 3Hw$
$1Hw + 1Hw^{+} \sim 1Hw + 2Hw^{+}$

Количественно фенотипическую изменчивость проявления генов оценивают двумя основными показателями, предложенными Н.В. Тимофеевым-Ресовским и). Фогтом: пенетрантностью и экспрессивностью.

Пенетрантность – доля особей (в %), у которых рассматриваемый признак, провился (хотя бы в незначительной степени), среди всех особей данного генотипа.

Экспрессивность – степень выраженности (в %) рассматриваемого признака по отношению к его максимальной выраженности среди всех особей данного генотипа.

И пенетрантность, и экспрессивность определяются не только генотипами особей рассматриваемой совокупности, но и условиями их обитания. Об этом свидетельствует возможность успешной «+» и «–» селекции по каждому из этих показателей и их вариация с изменением условий среды.

Не все особи, экспрессирующие тот или иной признак, проявляют его одинаково: обычно имеет место еще и количественная, и качественная, и топологическая вариация в проявлении признаков, обозначаемая также по Н.В. Тимофееву-Ресовскому, как **специфичность**. Рассмотренные нами три показателя, характеризующие фенотипическое проявление генов контролируются разными генами-модификаторами, о чем свидетельствует возможность независимой селекции по каждому из показателей в отдельности с получением любых их комбинаций.

Неполной пенетрантностью и варьирующими экспрессивностью и специфичностью обладают многие гены наследственных болезней человека, что затрудняет их выявление, особенно в малочисленных семьях и родословных, и последующее их детальное исследование.

Наконец следует отметить, что при рассмотрении влияния среды на характер проявления генов, генетикам не приходится ограничиваться обобщенным рассмотрением среды, как это бывает достаточно, например, экологам. На проявление того или иного гена могут оказывать влияние другие гены генома и их взаимодействие (*генотипическая среда*), внутренние факторы развития и физиологии организма (*внутренняя среда*) и факторы среды обитания организма (*внешняя среда*). Формальная схема взаимоотношений генов между собой и с факторами дифференциально понимаемой среды приведена на рис. 6.4. Схема иллюстрирует, как на пути от гена (a) через промежуточное состояние (α) к конечному (дефинитивному) признаку (A) в процесс формирования последнего вовлекаются на разных этапах ряд генов той же (b, c) и иных (d, e, f, g, h, i, k, l, m, n) хромосом, вариация условий внутренней (x) и внешней (p, o, q) среды организма.

Весьма близкие представления развивал и Б.Л. Астауров, выражая их формулой

$$a = F(p, g, e, i),$$

где a – окончательное значение функции развития (F), p – плазматические факторы развития, g – генотип, e – совокупность факторов внешней среды (*medium externum*), i – совокупность факторов внутриорганизменной среды (*medium internum*).

На сегодня в схеме Н.В. Тимофеева-Ресовского и формуле Б.Л. Астаурова не достает только одного элемента – взаимодействия названных ими факторов или, рассматривая развитие организма в целом, интеграции всех локальных процессов в целостную систему онтогенеза. Тогда формула Б.Л. Астаурова расширится до

$$a = F(p, g, e, i), c,$$

где c – взаимодействие выше перечисленных факторов (*co-operatio*).

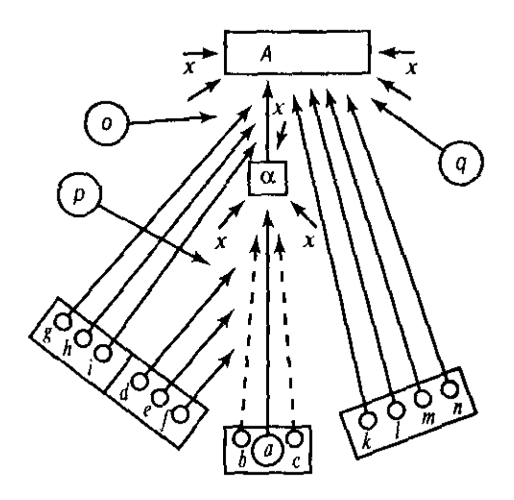


Рис. 6.4. Схема проявления гена. (Из: Тимофеев-Рессовский и Иванов, 1966)

Проявление гена (a) в признаке (A) подвергается на промежуточных (a – α; α – A) и конечном этапах модифицирующему действию генотипической (b – n), внутренней (x) и внешней (p – o) среды

Благодаря интенсивному развитию биологии во второй половине XX столетия, раскрытию молекулярно-генетических, биофизических, биохимических и физиологических механизмов онтогенеза, стало возможным конкретизировать отдельные формальные элементы рассмотренных схем, заменив их конкретными генетическими, клеточными и гуморальными факторами, участвующими в конкретных процессах жизнедеятельности. Основные из уже ставших ясными звенья системы жизнедеятельности человека и других организмов в норме и патологии рассмотрены в соответствующих главах книги. Здесь же речь пойдет о вариациях фенотипа, связанных не с изменениями генотипа, а с влиянием обычных факторов среды (температура, влажность, питание и т.п.). Такие ненаследственные изменения фенотипа называются в генетике **модификациями**. Соответственно, изменчивость такого рода называется модификационной изменчивостью в отличие от мутационной и рекомбинационной наследственной изменчивости.

6.2. МОДИФИКАЦИИ И НОРМА РЕАКЦИИ

Представления о наследовании благоприобретенных в индивидуальной жизни организма (обычно адаптивных) признаков бытовало среди биологов не одно столетие. Особенно твердо его придерживался крупный французский зоолог конца XVIII – первой половины XIX века и автор оригинальной теории адаптивной эволюции Ж.-Б. Ламарк. В догенетический период развития биологии такие представления были чисто умозрительными, не опирались на точные экспериментальные данные. Например, тот же Ламарк утверждал, что современные жирафы обязаны своей длинной шеей тому обстоятельству, что их отдаленные предки, съев траву и объев нижние ветви деревьев, стали тянуться к более высоко расположенным ветвям деревьев и их шеи несколько удлинились. Поскольку этот признак оказался адаптивным, то его унаследовали ближайшие потомки тех про-жирафов и развили его дальше. Так постепенно сформировались современные длинношеие жирафы. Отметим, что эта гипотеза Ламарка не имела и не имеет ни палеонтологического, ни экспериментального подтверждения.

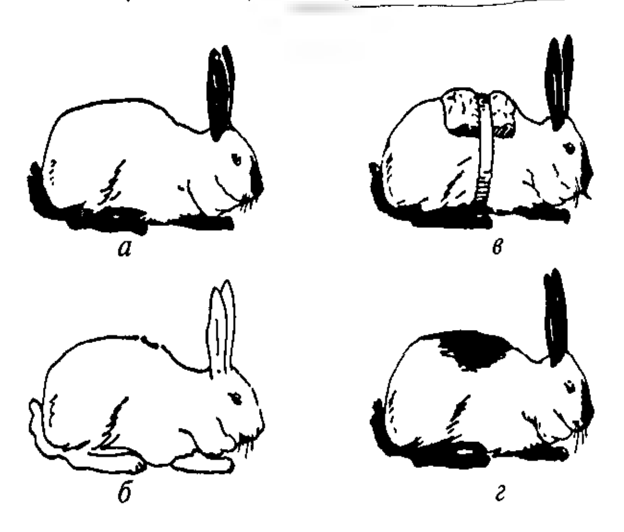
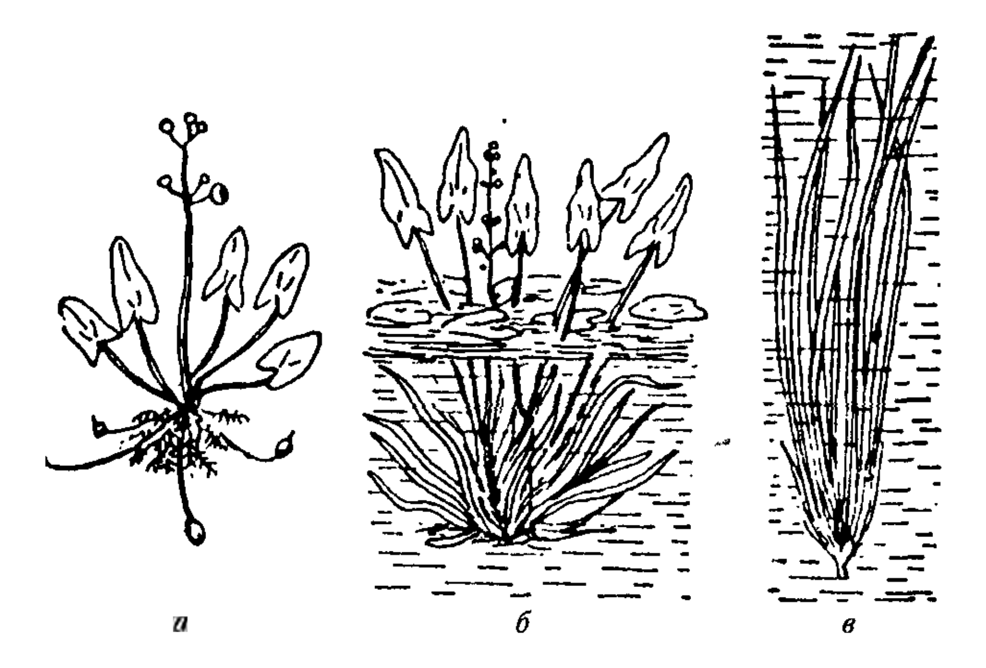


Рис. 6.5. Изменения окраски шерсти у кролика горностаевой породы под влиянием изменений температуры (Из: Гершензон, 1983)

а – кролик, выращенный при обычной температуре (14–18 °С); б – кролик выращенный с момента рождения при температуре свыше 30 °С; в – кролик, у которого на спине выщипана шерсть и на это место привязан пузырь со льдом, г – тот же кролик после отрастания шерсти на выщипанном месте

Развитие научных методов гибридологического и генетического анализа предшественниками Г. Менделя, им самим и его последователями сделало возможным различать наследственные признаки, задатки которых передаются при половом размножении в ряду поколений, и ненаследственные признаки, которые могут передаваться только в ряду соматических клеток при вегетативном размножении.

Приведем пример. Кролики так называемой «гималайской» породы имеют своеобразную пеструю окраску меха (рис. 6.5): основной фон шерстного покрова – белый; мордочки, кончики ушей и лап, а также хвосты – черные. Размер черных пятен зависит от температуры содержания гималайских кроликов. При обычных «комнатных» температурах зверьки имеют такую окраску, как сказано выше, при повышенных температурах размер черных пятен уменьшается, а при температурах выше 30 °С на всем теле формируется белая шерсть; при пониженных температурах размер черных пятен увеличивается, а при температурах близких к 0 °С – гималайские кролики приобретают чисто черную окраску. Если выщипать белую шерсть, например, на спине у гималайского кролика, и в дальнейшем содержать его при пониженной температуре, то на выщипанном участке отрастет черная шерсть, а при нормальной температуре – белая. Можно пойти дальше: получить потомство от гималайских кроликов с обычной для них и модифицированной окраской и убедиться, что модификация окраски потомству не передается; у потомков формируется (или не формируется) пигментация соответственно температуре их содержания. Таким свойством обладают все кролики гималайской породы, но не обладают кролики других пород белой или черной окраски.



с. 6.6. Модификации листьев стрелолиста под влиянием внешних условий. (Из: шензон, 1983)
воздушные листья; б – воздушные, плавающие и подводные листя; в – подводные листья

Такая наследственная способность к изменению фенотипа в определенных пре-ах при изменении условий жизни называется **нормой реакции**. В нашей стране бенно детально исследовал закономерности реакции разных видов организмов на іенения условий жизни академик И.И. Шмальгаузен. Им и другими авторами бы-экспериментально установлено, что разным генотипам свойственны свои преде-(узкие или широкие) ненаследственной модификации признаков при изменени-'словий жизни в пределах их толерантности.

Модификационная изменчивость присуща всем видам организмов: от самых імитивных до наиболее сложных, включая человека. В зависимости от режима 'ания человек может полнеть или худеть; в зависимости от интенсивности УФ-об-ения кожа человека может темнеть или светлеть. Однако, при переходе от пере-іня к недоеданию человек теряет вес, а при переходе от летнего режима освеще-и открытой одежды к зимнему режиму освещения и закрытой зимней одежде падает летний загар.

Другой пример – из мира растений. В пресных водоемах умеренной зоны доволь-іасто встречаются растения стрелолиста (рис. 6.6). У этого вида растений обычно эмируются листья в трех разных средах: нижняя часть листьев развивается под по-хностью воды, средние листья плавают на поверхности воды, а верхние листья гут на воздухе. Так вот, подводные листья имеют лентовидную форму без череш-

ков, плавающие – эллиптическую на умеренной длины черешках, а воздушные – стреловидную на особенно длинных черешках. При изменении уровня воды можно наблюдать соответствующие изменения формы листьев у всех растений стрелолиста, а не у отдельных их особей, что имеет место при мутационных изменениях. Также в отличие от мутаций действие модификаций прекращается с прекращением действия вызвавшего их фактора и не передается потомкам при половом размножении.

Еще одно отличие модификаций от мутаций – адаптивность большинства модификаций, их приспособленность к вызвавшему их фактору, в то время как один и тот же мутагенный фактор индуцирует широкий спектр редких мутационных изменений, разных у разных особей

Наряду с другими факторами фенотипической изменчивости живых существ, рассмотренными Н.В. Тимофеевым-Ресовским и Б.Л. Астауровым, модификации существенно расширяют диапазон вариации проявления генов у всех организмов, включая человека, в том числе расширяют полиморфизм его наследственных болезней.

лава

СЦЕПЛЕНИЕ ГЕНОВ И КРОССИНГОВЕР

7.1. ЗАКОНОМЕРНОСТИ СЦЕПЛЕННОГО НАСЛЕДОВАНИЯ

од сцеплением генов генетики понимают совместное наследование генов, локализованных в одной хромосоме. Независимо (как это было в опытах Г. Менделя) неаллельные гены ведут себя только в том случае, если они находятся в негомологичных хромосомах. Тогда их поведение объясняется независимым расхождением и свободной комбинаторикой негомологичных хромосом в мейозе (см. гл. 2).

Впервые сцепленное наследование признаков в дигибридном скрещивании обнаружили У. Бэтсон и Р. Пеннет у душистого горошка *Lathyrus odoratus* при изучении наследования окраски цветка и формы пыльцевых зерен. Классическими же опытами по анализу сцепленного наследования были эксперименты Т. Моргана, исследовавшего закономерности наследования мутаций *black* (*b* – черное тело) и *vestigial* (*vg* – редуцированные крылья) у *D. melanogaster*. Аллели дикого типа определяют серую окраску тела (b^+) и нормальные крылья (vg^+) и доминируют над мутантными аллелями. При скрещивании самок с черным телом и нормальными крыльями ($b\ vg^+/b\ vg^+$) с серыми самцами, имеющими редуцированные крылья ($b^+\ vg/b^+\ vg$), все потомство F_1 имело признаки дикого типа.

P: ♀ $b\ vg^+/b\ vg^+$ черное тело, нормальные крылья	×	♂ $b^+\ vg\ /b^+\ vg$ серое тело, редуцированные крылья
F_1 $b\ vg^+/b^+\ vg$ серое тело, нормальные крылья	×	$b\ vg/b\ vg$ черное тело, редуцированные крылья

Результаты анализирующего скрещивания потомков F_1 оказываются разными. В зависимости от пола гибридов обнаруживается или полное сцепление генов, или неполное.

7.1.1. ПОЛНОЕ СЦЕПЛЕНИЕ

Если для анализирующего скрещивания взять дигетерозиготного самца F_1 и самку, гомозиготную по рецессивным аллелям ($b\ vg/b\ vg$), то получится только два класса

потомков: 50% мух серых с редуцированными крыльями и 50% – черных с нормальными крыльями.

F_1 : ♂ $b\ vg^+/b^+\ vg$ × ♀ $b\ vg/b\ vg$

F_a 50% $b^+\ vg/b\ vg$; 50% $b\ vg^+/b\ vg$

Это означает, что у дигетерозиготных самцов $b\ vg^+/b^+\ vg$ образуется только два типа гамет ($b\ vg^+$ и $b^+\ vg$). Если бы гены b и vg наследовались независимо, то дигетерозиготные самцы F_1 дали бы 4 типа гамет ($b\ vg$, $b\ vg^+$, $b^+\ vg$, $b^+\ vg^+$) и, соответственно в потомстве анализирующего скрещнвания былн бы представлены 4 фенотнпических класса в соотношении 1:1:1:1. Морган в своих опытах показал, что гены могут наследоваться сцепленно, что приводит к появлению в потомстве только родительских комбинаций генов ($b\ vg^+$ и $b^+\ vg$). У самцов дрозофилы выявляется полное сцепление генов.

7.1.2. НЕПОЛНОЕ СЦЕПЛЕНИЕ

При реципрокном направлении скрещивания (самки – дигетерозиготы, самцы - гомозиготы по рецессивным аллелям обоих генов) результаты анализирующего скрещивания иные:

F_1 ♀ $b\ vg^+/b^+\ vg$ × ♂ $b\ vg/b\ vg$

F_a 41.5% $b\ vg^+/b\ vg$; 41.5% $b^+vg/b\ vg$; 8.5% $b\ vg/b\ vg$; 8.5% $b^+vg^+/b\ vg$

Сочетания признаков исходных родительских линий (Р-поколения), сохранившиеся у потомков анализирующего скрещивания, являются нерекомбинантными: $b\ vg^+$ (черное тело, нормальные крылья) и b^+vg (серое тело, редуцированные крылья). Видно, что родительские сочетания образовались в 83% случаев. Новые, рекомбинантные, сочетания $b^+\ vg^+$ и $b\ vg$ составляют 17% потомков. Таким образом, в данном случае наблюдается неполное сцепление генов.

Полное сцепление у дрозофилы наблюдается только к том случае, когда для анализирующего скрещивания берут дигибридных самцов, если же скрещивают дигибридных самок с гомозиготными по рецессивным аллелям самцами, то сцепление никогда не бывает полным.

7.1.3. КРОССИНГОВЕР

Опираясь на наблюдения Ф. Янсенса (1909), обнаружившего в мейозе хиазмы, Т. Морган постулировал, что гены b и vg локализованы в одной хромосоме, и в потомстве анализирующего скрещивания особи $b\ vg/b\ vg$ и $b^+\ vg^+/b\ vg$ появились в результате перекреста гомологичных хромосом и обмена участками между генами b и vg. Процесс перекреста был назван **кроссинговером**. Отсутствие рекомбинантных потомков (и, следовательно, хромосом) в потомстве самцов объясняется тем, что у дро-

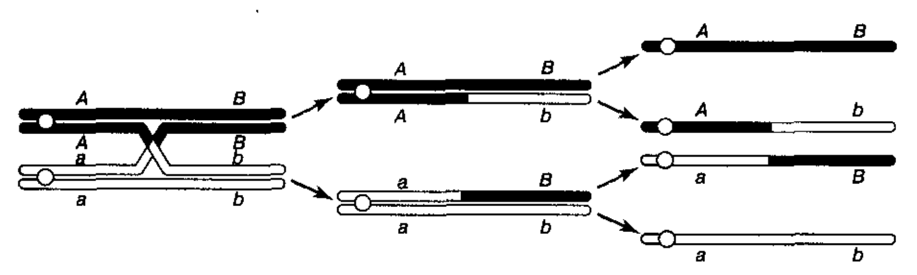


Рис. 7.1. Кроссинговер на стадии четырех хроматид

офилы при сперматогенезе кроссинговер не происходит. Таким образом, описанный эксперимент Моргана и его сотрудников позволил сделать вывод о соответствии эупп сцепления и хромосом и явился генетическим доказательством кроссинговеа. Кроссинговер проявляется как неполное сцепление. Вскоре феномен кроссинговера был обнаружен и у других организмов — кукурузы, львиного зева, мышей и т.д.

Генетические и цитологические исследования, проведенные на большом числе идов животных и растений, позволили сформулировать следующие положения о еханизме кроссинговера. Кроссинговер между несестринскими хроматидами происходит в мейозе на стадии четырех нитей. В каждой точке обмена происходит разрыв и воссоединение только двух из четырех хроматид (рис 7.1). На рисунке видно, то из четырех продуктов мейоза две хроматиды являются рекомбинантными, две ругие сохраняют родительские комбинации генов. На участке между генами А и В ожет происходить два и больше обменов, если гены достаточно далеко отстоят друг г друга. Во множественных обменах могут участвовать две, три и четыре хроматиды.

Если гены расположены так далеко друг от друга, что вероятность обмена между ими равна 100%, то 50% гамет будет нести хромосомы с родительской комбинаций генов (некроссоверные), а 50% будут кроссоверными, с новой комбинацией геов, и в потомстве будет обнаруживаться соотношение 1:1:1:1. Таким образом, обнаруживаемая частота рекомбинации между двумя генами не превышает 50%, даже есл между генами происходят и множественные обмены.

7.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАССТОЯНИЯ МЕЖДУ ГЕНАМИ

Стертевант предположил, что частота кроссинговера между генами, локализованными в одной хромосоме, может служить мерой расстояния между ними: чем выше астота кроссинговера, выражаемая отношением числа кроссоверных особей к обему числу особей в потомстве анализирующего скрещивания, тем больше расстояне между генами. Так, при анализе наследования и рекомбинации мутаций *b* и *vg* бщее количество кроссоверных потомков составляет 17%, это соответствует рассто-

янию между генами *b* и *vg* – 17 морганид (морганида – названная в честь Т. Моргана единица генетического расстояния, на котором кроссинговер происходит с частотой 1%; в зарубежных источниках эту единицу принято называть «сантиморган»).

7.2.1. ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ЛИНЕЙНОГО РАСПОЛОЖЕНИЯ ГЕНОВ В ХРОМОСОМЕ

Изучение относительного расстояния между генами позволило Стертеванту сделать вывод о линейном расположении генов в хромосомах. Так, при определении расстояния между тремя генами Х-хромосомы дрозофилы: *y* (*yellow* – желтое тело), *w* (*white* – белые глаза) и *bi* (*bifid* – нарушенное жилкование и форма крыла), частота кроссинговера между генами *y* и *bi* составила 4.7%; между генами *y* и *w* – 1,2%, а между генами *w* и *bi* – 3,5%. Взаимное расположение этих генов можно представить следующим образом:

1. 2%   3. 5%
y —— *w* ———— *bi*

Расстояние 4,7% между крайними генами *y* и *bi* равно сумме расстояний 1,2% между *y* и *w* и 3,5% между *w* и *bi*.

7.2.2. УЧЕТ ДВОЙНОГО КРОССИНГОВЕРА

Часто при определении расстояния между далеко отстоящими друг от друга генами (например, *A* и *B*) нарушается правило аддитивности расстояний. Если между генами *A* и *B* находится еще один ген *C*, то расстояние *AB* не всегда равно сумме расстояний *AC* + *CB*, если *AB* достаточно велико.

Морган предположил, что кроссинговер между двумя генами может происходить не только в одной, но и в двух и даже большем числе точек (двойной, тройной и т.д. кроссинговер). Четное число перекрестов между двумя генами не приведет к их перемещению из одной гомологичной хромосомы в другую, поэтому расстояние между этими генами, определенное по числу кроссинговеров, снижается. Поправку на двойной кроссинговер легко сделать, проанализировав численность всех фенотипических классов в потомстве анализирующего скрещивания при трехточковом методе (анализе взаимного расположения трех генов). В таблице 7.1 указаны потомки анализирующего скрещивания тригетерозиготы *A B C/a b c*, несущие некроссоверные хромосомы, хромосомы, появившиеся в результате одного обмена на участке *AB* или *BC*, и хромосомы, возникшие в результате двух обменов одновременно и на участке *AB*, и на участке *BC*.

Расстояние между генами *A* и *B* равно сумме частот одинарных кроссоверов (5, 6) и двойных (7, 8). Аналогично определяется расстояние между второй парой генов: *B* и *C* (3, 4, 7, 8). Порядок расположения генов можно определить по двойным кроссо-

'аблица 7.1. **Кроссоверные и некроссоверные потомки от скрещивания**
I B C/a b c × a b c/a b c

Потомки	Генотип
Іекроссоверные	1. *A B C/a b c*
	2. *a b c/a b c*
)динарный кроссинговер	3. *A B c/a b c*
	4. *a b C/a b c*
	5. *a B C/a b c*
	6. *A b c/a b c*
(войной кроссинговер	7. *A b C/a b c*
	8. *a B c/a b c*

ерам, частота которых всегда ниже, чем всех других классов. Поскольку 7-й и 8-й лассы могут появиться только в том случае, если ген *B* находится между генами *A* и ', расположение генов в хромосоме *A – B – C*.

Расстояние между генами *AC* равно частоте одинарных кроссоверов плюс удвоенная частота двойных кроссоверов. Число двойных кроссоверов удваивается, т.к. они вляются следствием одновременно двух перекрестов хромосом.

7.2.3 ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

Іри определении расстояний между генами оказывается, что число двойных кроссовеов меньше, чем теоретически ожидается (под теоретически ожидаемой частотой двойого кроссинговера между генами *A* и *C* понимают произведение частот одинарных кросинговеров между генами *AB* и *BC*). Подавление кроссинговера на участках, непосредстнно прилегающих к точке произошедшего обмена, называется **интерференцией**. Г. Мелр предложил определять интенсивность интерференции количественно, путем деления фактически наблюдаемой частоты двойных кроссинговеров на теоретически ожидамую. Он назвал этот показатель коэффициентом коинциденции, т.е. совпадения. Так, ли частота рекомбинации между генами *A* и *B* составляет 10%, между *B* и *C* – 15%, а исло двойных рекомбинантов (*AbC* и *aBc*) – 0,045%, то коэффициент коинциденции соавляет:

$$C = 0{,}00045/(0{,}1 \times 0{,}15) = 0{,}03.$$

Если коэффициент коинциденции меньше единицы ($C < 1$), то интерференция эложительна, т.е. один обмен препятствует обмену на соседнем участке хромосоы. Если $C > 1$, то интерференция отрицательна, т.е. один обмен как бы стимулиру- дополнительные обмены на соседних участках. В действительности обнаружена элько положительная интерференция.

7.3. КАРТИРОВАНИЕ ГЕНОВ

7.3.1. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КАРТЫ

Генетическое картирование – это определение группы сцепления и положения картируемого гена относительно других генов данной хромосомы.

Чем больше генов известно у данного вида, тем точнее результаты этой процедуры. Как правило, число генов в группах сцепления зависит от линейных размеров соответствующих хромосом. Однако, протяженные области конститутивного гетерохроматнна (в районе центромеры и теломерных участков) практически не содержат генов и, таким образом, нарушают эту зависимость.

На первом этапе картирования определяют принадлежность гена к той или иной группе сцепления. Как известно, у *D. melanogaster* в диплоидном наборе четыре пары хромосом: первая пара – половые хромосомы (XX – у самок, XY – у самцов), вторая, третья и четвертая – аутосомы. Число генов в Y-хромосоме самцов очень мало. Для локализации вновь возникшей мутации необходимо располагать набором маркерных генов для каждой хромосомы. Картирование мутации основывается на анализе ее сцепления с этими маркерами. Например, если интересующая нас мутация наследуется независимо от маркеров второй хромосомы, делается вывод о ее принадлежности к другой группе сцепления. Скрещивания проводятся до тех пор, пока не удастся выявить сцепленное наследование анализируемой мутации с маркерными мутациями какой-либо хромосомы.

Второй этап картирования подразумевает определение положения гена на хромосоме. Для этого подсчитывают расстояние между этим геном и уже нзвестными, маркерными генами. Для подсчета генетических расстояний проводят специальные скрещивания, в потомстве которых учитывают частоты кроссоверных и некроссоверных особей. Предполагается, что расстояние между двумя генами пропорционально частоте кроссинговера между ними. Следует иметь в виду, что, чем дальше расположены друг от друга гены, тем чаще между ними происходят множественные перекресты и тем больше искажается истинное расстояние между этими генами. Частая рекомбинация между расположенными далеко друг от друга генами может привести к увеличению числа кроссоверных организмов в потомстве анализирующего скрещивания до 50%, имитируя независимое наследование изучаемых признаков. Поэтому при составлении карт расстояния между далеко расположенными генами следует использовать не непосредственный подсчет числа кроссоверных особей в анализирующих скрещиваниях, а сложение расстояний между многими близко расположенными друг от друга генами, находящимися внутри нзучаемого протяженного участка. В этом случае сцепление между далеко расположенымн генами можно установить по их сцепленному наследованию с промежуточно-расположенными генами, которые в свою очередь сцеплены между собой. В результате такого метода определения расстояний между генами длины карт хромосом могут превышать 50 морганид. Так, у дрозофилы генетическое расстояние между генами, лежащими в разных концах хромосомы 2, составляет 107 морганид.

7.3.2. ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ КАРТЫ

Этот метод основан на использовании хромосомных перестроек. При облучении и цействии других мутагенов в хромосомах часто наблюдаются потери (делеции) или вставки (дупликации) небольших фрагментов, сравнимых по величине с одним или несколькими локусами. Например, можно использовать гетерозиготы по хромосомам, одна из которых будет нести группу следующих друг за другом доминантных аллелей, а гомологичная ей – группу рецессивных аллелей тех же генов *ABCDE/abcde*. Если в хромосоме с доминантными генами произошла утрата отдельных генов, например *DE*, то у гетерозиготы *ABC/abcde* будут проявляться рецессивные признаки *de*. На этом принципе основан *метод перекрывающихся делеций*, используемый при построении цитологических карт. Например, у дрозофилы составлены цитологические карты политенных хромосом, строение и функционирование которых уже рассматривалось в гл. 4. Напомним, что при окраске этих хромосом, в тысячу раз превышающих по размерам митотические хромосомы, на препаратах выявляются темноокрашенные диски и светлые участки – междиски. При этом каждая хромосома имеет свой индивидуальный рисунок чередования различных дисков (толстых, тонких, пунктирных) и междисков, что позволяет отличить одну хромосому от другой и разные участки одной хромосомы. На политенных хромосомах можно четко определять

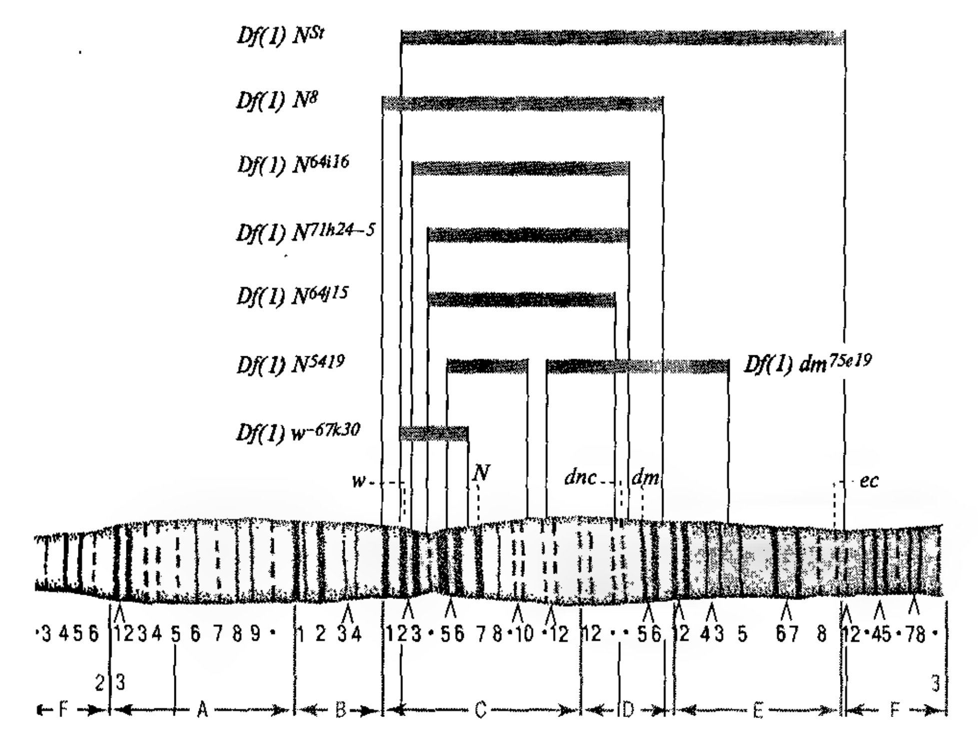


Рис. 7.2. Размеры и расположение делеций в политенной X-хромосоме дрозофилы. (По: Griffiths et al., 2000)

концы делеций. На рис. 7.2 приведены длины и расположение восьми делеций в Х-хромосоме. У гетерозигот по рецессивной мутации *w* будет проявляться признак белые глаза только при утрате нормального аллеля в гомологичной хромосоме. Так, у мух $Df(1)N^{8}/w$, $Df(1)N^{St}/w$ и $Df(1)N^{67k30}/w$ проявляется фенотип белые глаза, а у $Df(1)N^{64i16}/w$ – глаза красные. Следовательно, ген *white* расположен в общем для трех делеций участке 3С2-3С6 и левее дистального конца (ближе к теломере) делеции $Df(1)N^{64i16}$. Цитологические карты хромосом можно также строить с использованием *транслокаций* и *инверсий*. Первые цитологические карты хромосом *D. melanogaster* составлены Ф. Добжанским. Метод перекрывающихся делеций использовал С. Бензер при внутригенном картировании мутаций у фага Т4.

7.3.3. СРАВНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ КАРТ

В целом, сравнение генетических и цитологических карт хромосом показывает их соответствие: чем больший процент кроссинговера разделяет пару генов, тем больше и физическое расстояние между ними. Порядок расположения генов на этих картах совпадает, однако расстояния между генами могут заметно различаться. Это связано с тем, что кроссинговер в прицентромерных и теломерных районах у дрозофилы затруднен, поэтому и расстояния между генами на генетической карте в этих районах занижены. Кроме того, частота кроссинговера зависит от ряда факторов: температуры, возраста особей, их пола, жизнеспособности, а также присутствия генов, влияющих на частоту кроссинговера, и структуры хромосом. Вследствие этого определение частоты кроссинговера между одними и теми же генами у разных авторов может не совпадать и, кроме того, не соответствовать расстоянию на цитологической карте хромосом.

В настоящее время цитологические карты хромосом построены у различных организмов, в том числе и у человека. Это стало возможным благодаря использованию специальных методов дифференциального окрашивания хромосом с помощью флуоресцентных красителей или по Гимза. Эти методы выявляют на каждой хромосоме окрашенные и неокрашенные сегменты. При обозначении местоположения гена сначала указывается номер хромосомы, в которой он локализован, затем символ плеча (р – короткое и q - длинное), номер района и номер сегмента в пределах этого района. Например, запись 1q21 означает, что речь идет о хромосоме 1, длинном плече, районе – 2, сегменте – 1. Такая номенклатура сегментов позволяет описать цитологическую локализацию гена. Например, ген миодистрофии Дюшенна локализован в коротком плече Х-хромосомы Хр21 (см. гл. 19).

Развитие молекулярной биологии привело к появлению новых современных методов картирования генов. Один из них – ДНК-гибридизация *in situ*. Для локализации какого-либо гена получают информационную РНК, транскрибированную с этого гена, а затем с помощью обратной транскриптазы ее ДНК-копию (кДНК – комплементарная ДНК). После этого проводят гибридизацию с денатурированной хромосомной ДНК и по месту гибридизации определяют, в каком участке хромосомы локализован данный ген (см. гл. 18).

7.4. НЕРАВНЫЙ КРОССИНГОВЕР

ычно обмен участками между хроматидами гомологичных хромосом осуществля-я в строго идентичных, тождественных точках. Благодаря этому при перекресте)исходит обмен равными участками хромосом.

В очень редких случаях наблюдаются разрывы в несимметричных точках, и хро-ииды обмениваются неравными участками. Такое явление называют неравным эссинговером. Вследствие неравного кроссинговера участок одной из гомоло-ичных хромосом может удвоиться или утроиться, а в противоположной хромосо-образуется его нехватка. Например, изучая мутацию *Bar* (полосковидные глаза) розофилы, Стертевант в 1925 г. обнаружил, что фенотип «полосковидные глаза» ких мух обусловлен удвоением участка 16А в первой хромосоме. Но среди мух, сущих мутацию *Bar*, иногда выявлялись особи с еще более узкими глазами и му-с нормальными глазами. Оказалось, что хромосомы особей *ультра-Bar* имеют оенный участок 16А, у мух дикого типа хромосомы нормальные. По мнению ертеванта, такие хромосомы могли образоваться в результате неравного крос-иговера по участку 16А у гомозиготных особей *B/B* (см. рис. 13.5).

7.5. СОМАТИЧЕСКИЙ КРОССИНГОВЕР

вестно, что гомологичные хромосомы в профазе митоза обычно не вступают в си-тическую связь, а располагаются отдельно и независимо друг от друга. В то же емя описаны случаи, когда наблюдается митотическая конъюгация гомологичных)мосом и рекомбинация между несестринскими хроматидами.

Доказательство существования митотического кроссинговера было получено и наблюдении мозаичных пятен у мух с генотипом ($y\ sn^+/y^+\ sn$). Пятна образуют-тогда, когда рядом расположены два клона клеток, фенотипически отличающих-друг от друга и от клеток остальных тканей данной особи. Гены *y* (*yellow* – желтое те-) и *sn* (*singed* – «опаленные» щетинки) находятся в X-хромосоме. Самка $y\ sn^+/y^+\ sn$ ерозиготна по генам *y* и *sn*, и поэтому в отсутствие митотического кроссинговера фенотип будет нормальным. Однако если на стадии четырех хроматид между хро-идами гомологов (несестринскими хроматидами) произойдет кроссинговер, ичем место обмена будет находиться между геном *sn* и центромерой, то после за-онения деления могут образоваться клетки с генотипами $y\ sn^+/y\ sn^+$ и $y^+\ sn/y^+\ sn$. я этого необходимо, чтобы после кроссинговера хроматиды каждого из гомологов шли к одному полюсу клетки: y^+sn к одному полюсу, а $y\ sn^+$ – к другому. Потом-дочерних клеток, размножившись в имагинальных дисках на стадии личинки, разуют мозаичные пятна. В этом случае на сером теле мухи с нормальными ще-нками появятся два пятна, одно из которых будет желтого цвета с нормальными етинками, а другое – серого цвета с «опаленными» щетинками.

7.6. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА КРОССИНГОВЕР

Кроссинговер представляет собой один из регулярных генетических процессов, контролируемых многими генами как непосредственно, так и через физиологическое состояние клеток во время мейоза или митоза.

Гомо- и гетерогаметный пол. Для абсолютного большинства высших эукариот характерна примерно одинаковая частота кроссинговера как у гомогаметного, так и гетерогаметного пола. Однако есть виды, у которых кроссинговер отсутствует у особей гетерогаметного пола (например, у самцов дрозофилы и самок тутового шелкопряда), в то время как у особей гомогаметного пола он протекает нормально. При этом частота митотического кроссинговера у самцов и самок этих видов практически одинакова, что указывает на различные механизмы генетического контроля рекомбинации в половых и соматических клетках.

Структура хроматина. На частоту перекреста в разных участках хромосомы влияет распределение гетерохроматиновых и эухроматиновых районов. В областях конститутивного гетерохроматина (в прицентромерных и теломерных районах хромосом) частота кроссинговера снижена, поэтому расстояние между генами в этих участках, определенное по частоте кроссинговера, может не соответствовать действительному.

Функциональное состояние организма. Частота кроссинговера зависит от возраста организма. Так, у дрозофилы максимальная частота кроссинговера наблюдается в первые 10 дней жизни, в следующие 10 дней наблюдается ее снижение, а после трех недель жизни – вновь подъем частоты рекомбинации. Можно предположить, что функциональное состояние организма влияет на течение различных стадий мейоза, т.к. степень спирализации хромосом, скорость прохождения различных стадий профазы может в сильной степени зависеть от физиологического состояния клеток.

Генотип. У разных видов обнаружены гены, изменяющие частоту кроссинговера. Они могут, как увеличивать, так и уменьшать частоту этого события. В качестве запирателей перекреста выступают также хромосомные перестройки, в частности инверсии и транслокации, так как они затрудняют нормальную конъюгацию хромосом в зиготене. У дрозофилы обнаружен так называемый интрахромосомный эффект перестроек на частоту кроссинговера. Если в хромосоме, несущей инверсию, частота кроссинговера снижается, то в другой негомологичной структурно нормальной хромосоме частота кроссинговера возрастает.

Экзогенные факторы. На частоту рекомбинации могут влиять различные факторы внешней среды: температура, ионизирующие излучения, концентрация солей, химические мутагены, лекарства, гормоны. При большинстве указанных воздействий частота кроссинговера повышается. По частоте различных типов рекомбинаций (мейотический и митотический кроссинговер, сестринские хроматидные обмены) можно судить о мутагенном действии лекарственных препаратов, канцерогенов, антибиотиков и т.д.

8 ГЕНЕТИКА ПОЛА

8.1. ОСНОВНЫЕ ТИПЫ ДЕТЕРМИНАЦИИ ПОЛА

В процессе развития зиготы происходит становление пола (дифференцировка), приводящее к возникновению наследственно закрепленных различий между мужскими и женскими особями. Половое размножение, широко распространенное в природе, связано с формированием гамет – мужских и женских гаплоидных половых клеток, которые, соединяясь между собой в процессе оплодотворения, дают начало диплоидным клеткам – зиготам.

По отношению к моменту оплодотворения различают три типа детерминации (определения) пола:

1) *прогамный* (весьма редкий тип, характеризующийся детерминацией пола зигот в процессе созревания яйцеклеток).

Так, у коловраток *Rotatoria*, тли *Philloxera vastatrix* и первичных кольчецов *Dinophilus* яйцеклетки в результате неравномерного распределения цитоплазмы в процессе оогенеза становятся различными по размеру еще до оплодотворения. И большие, и малые ооциты имеют одинаковые хромосомные наборы. После оплодотворения крупных яйцеклеток развиваются только самки, а мелких, относительно бедных цитоплазмой – только самцы (рис. 8.1). Следовательно, половая детермина-

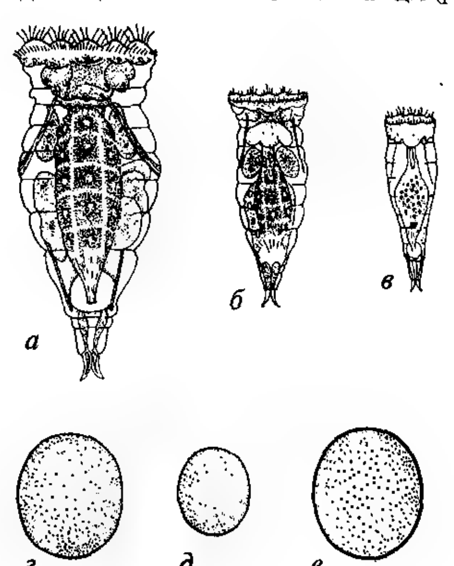


Рис. 8.1. Прогамный тип детерминации пола у коловраток. (Из: Гершензон, 1983)

а – взрослая самка, б – молодая самка, в – самец. Самки обычно откладывают крупные яйца (г), партеногенетически (без оплодотворения) развивающиеся в самок, но при изменении пищевого режима у этих самок появляются дочери, откладывающие более мелкие яйца (д), партеногенетически развивающиеся в гаплоидных самцов. Если самка, откладывающая такие мелкие яйца, вскоре после вылупления будет оплодотворена самцом, то оплодотворенные яйца продолжат рост, покроются толстой оболочкой (е), перезимуют и весной разовьются в обычную диплоидную самку

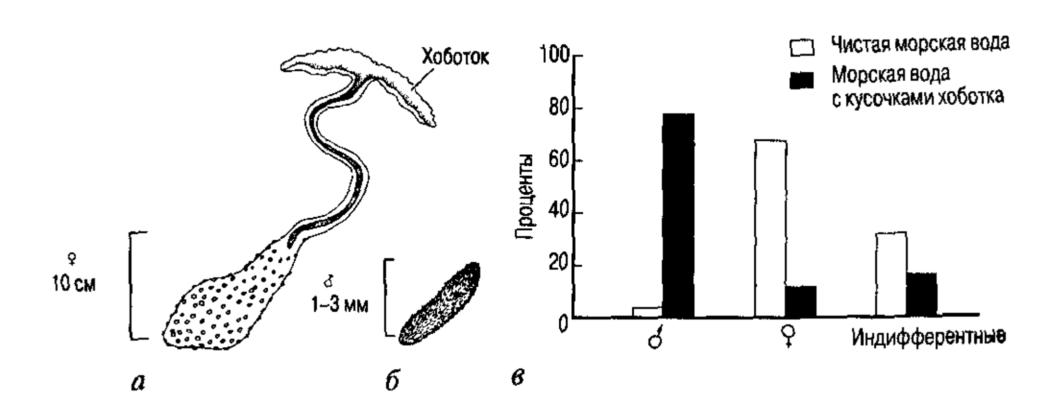


Рис. 8.2. Эпигамный тип детерминации пола у *Bonellia viridis*. (Из: Гилберт, 1995)

а - самка длиной около 10 см с хоботком, который способен вытягиваться до одного метра; б - самец (сильно увеличен по сравнению с самкой), в - анализ дифференцировки Bonellia in vitro. Личинок Bonellia помещали в морскую воду с кусочками хоботка самки. Большинство особей, культивированных в таких условиях, стали самцами, тогда как в чистой морской воде из личинок преимущественно развились самки

ция яйцеклеток происходит задолго до оплодотворения. Однако факторы, детерминирующие рост ооцитов, остаются неизвестными;

2) *эпигамный* (детерминация пола происходит после оплодотворения под влиянием самых разнообразных внешних условий; имеет место у ограниченного числа видов).

Например, у морского червя *Bonellia viridis* самки или самцы развиваются в зависимости от того, прикрепится или нет личинка к телу материнского организма (рис. 8.2, *а*, *б*). Если личинка осядет на хоботок самки-матери, то она попадет сначала в рот, а затем – в матку, где дифференцируется в самца. Этот самец проведет в теле самки-матери остаток жизни, оплодотворяя яйца. Та же личинка, но осевшая на грунт, становится самкой. Добавление в морскую воду экстракта ткани хоботка инициирует формирование самцов из большинства личинок (рис. 8.2, *в*). Следовательно, данный экстракт служит источником аттрактанта, детерминирующего оседание личинок на хоботок и их дальнейшую маскулинизацию.

Другой пример формирования пола в зависимости от внешних условий являют улитки *Crepidula fornicata*. В определенный момент жизненного цикла они заползают друг на друга, образуя пирамиду; положение в этой пирамиде и определяет пол каждого моллюска. Половая дифференцировка проходит несколько стадий, но молодые особи – всегда мужского пола. Этот период сменяется лабильным состоянием. На следующей стадии развития моллюск, прикрепленный к самке, становится самцом, а близкое соседство многочисленных самцов приводит к трансформации некоторых из них в самок. Но если пол особи стал женским, то он никогда не трансформируется в мужской.

Решающим фактором детерминации пола у большинства черепах и всех видов крокодилов, в отличие от других рептилий (змей и ящериц), является температура в определенный период развития яйца: у каймановой черепахи, например, это – средняя треть периода эмбрионального развития. Лишь небольшой температурный интервал (27–30 °С) позволяет выводиться из одной и той же кладки яиц и самцам, и самкам. За границами же этого интервала развиваются особи одного пола: либо самцы (при температуре ниже 27 °С), либо самки (при температуре выше 30 °С).

Несмотря на то, что ряд факторов эпигамного типа детерминации пола установлен, генетические механизмы его продолжают оставаться неясными;

3) *сингамный* (пол зиготы детерминирован с момента оплодотворения).

При гетерогаметности мужского или женского пола гаметы одного типа, образующиеся у особей гомогаметного пола могут быть оплодотворены двумя разными типами гамет, формируемых у особей гетерогаметного пола. Этот истинно сингамный тип детерминации пола зиготы присущ большинству живых организмов, в том числе человеку и классическому объекту генетики – дрозофиле; именно этот тип рассмотрен в данной главе наиболее подробно;

4) *эусингамный* (или гаплодиплоидный тип детерминации пола).

У пчел, ос, муравьев, пилильщиков и наездников отсутствуют половые хромосомы. Из оплодотворенных яиц пчелиной матки или самок других перепончатокрылых насекомых развиваются самки с диплоидным набором хромосом, а партеногенетически, из неоплодотворенных – гаплоидные самцы-трутни. Самки подразделяются на два типа: крупные плодовитые матки и небольшие стерильные рабочие пчелы. Эти два пути развития определяются количеством и качеством пищи, которой была выкормлена личинка.

Первичная гаплоидность присуща только клеткам зародышевого пути трутней, т.е. клеткам, из которых образуются гаметы. В соматических клетках трутней число хромосом вторично удваивается. Те трутни, в соматических клетках которых восстановленная диплоидность сопряжена с гомозиготизацией рецессивных генов, снижающих жизнеспособность, погибают на стадии личинки или уничтожаются рабочими пчелами. Тем самым обеспечивается элиминация неблагоприятных генов из пчелиной семьи.

8.2. ТИПЫ ХРОМОСОМНОЙ ДЕТЕРМИНАЦИИ ПОЛА

В конце XIX века при изучении некоторых насекомых было обнаружено, что хромосомные наборы самцов и самок различаются между собой. В дальнейшем работами школы Т. Моргана, а также американского цитолога Э. Вильсона было сформулировано положение о том, что важнейшая роль в генетической детерминации пола принадлежит хромосомному аппарату.

Как было отмечено выше, наиболее распространенный тип определения пола – сингамный, при котором пол детерминирован с момента оплодотворения. Как вы-

яснилось в дальнейшем, механизм этого феномена основан на разных сочетаниях половых хромосом. В зависимости от числа и состава половых хромосом выделяют три основных типа хромосомного определения пола, названных по тем видам живых организмов, у которых данный тип был впервые описан.

1. *Ligaeus (Ligaeus turcicus* – водяной клоп). Теперь чаще называют типом дрозофилы или человека.

Женский пол – гомогаметный (все яйцеклетки содержат X-хромосому), мужской – гетерогаметный (образуется два типа сперматозоидов, одни из них несут X-хромосому, другие – Y). Встречается у млекопитающих (в том числе – у человека) и рыб, у двукрылых насекомых, а также у двудомных растений.

2. *Protenor* (*Protenor belfragi* – другой род водяного клопа).

Женский пол – гомогаметный (XX), мужской – гетерогаметный (XO). Этот тип характерен для большинства прямокрылых насекомых, многих клопов, жуков, пауков, многоножек и нематод.

3. Менее распространен тип хромосомного определения пола, при котором гетерогаметность присуща женским особям, а гомогаметность - мужским. Первоначально он был открыт у бабочки крыжовенной пяденицы *Abraxas grossulariata*, затем описан у птиц, некоторых видов рыб, земноводных. В случае женской гетерогаметности каждую из одинаковых половых хромосом у особей мужского пола обозначают буквой Z, половую хромосому, присущую только самкам – буквой W. Но кроме (ZW-ZZ)-типа хромосомного определения пола, встречается и другой тип – Z0-ZZ. В этом случае половина гамет у самок несет половую Z-хромосому, а в остальных гаметах половые хромосомы отсутствуют. Такой тип характерен для некоторых бабочек.

Гетерогаметность мужского пола (типы XX-XY и XX-X0) распространена значительно шире, чем гетерогаметность женского пола (типы ZW-ZZ и Z0-ZZ). В некоторых систематических группах (насекомые, рыбы, земноводные, цветковые растения) встречаются как виды с мужской гетерогаметностью, так и виды с женской гетерогаметностью.

8.3. ХРОМОСОМНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ДЕТЕРМИНАЦИИ ПОЛА У ДРОЗОФИЛЫ

8.3.1. ГИНАНДРОМОРФИЗМ

У дрозофилы, непарного шелкопряда, кур и певчих птиц иногда появляются особи-**гинандроморфы**, одна половина тела которых имеет признаки женского пола, а другая – мужского. Анализ хромосом у таких организмов оказался чрезвычайно полезным для формирования общих представлений об основах детерминации пола.

Гинандроморфы встречаются у видов с четко выраженными признаками полового диморфизма. Различают несколько видов гинандроморфов:

1) билатеральные (одна продольная половина тела имеет признаки мужского пола, другая – женского);

2) передне-задние (передняя часть тела несет признаки одного пола, а задняя другого);

3) мозаичные («мужские» участки тела перемежаются с «женскими»).

Из зигот, несущих две Х-хромосомы, т.е. из потенциальных самок могут развиться монозиготные гинандроморфы. Это происходит следующим образом. Если у дрозофилы во время первого деления дробления, на стадии двух бластомеров, одно из дочерних ядер получит обе Х-хромосомы, а другое – только одну (в силу физического отставания второй Х-хромосомы и последующего лизиса), то кариотип второго ядра будет ХО, т.е. мужским. Поскольку гормональная регуляция, способная модулировать такие явления, у насекомых отсутствует, каждая клетка дает потомков своего пола. Таким образом, у взрослой мухи одна половина клеток тела окажется женского типа (потомки клетки с ядром, содержащим две Х-хромосомы), а другая – мужского типа (потомки клетки с ядром ХО). Гинандроморфы могут быть легко распознаны, если Х-хромосомы гетерозиготны по каким-либо генам. Например, если потеряна Х-хромосома с доминантным аллелем гена (w^+), то при гетерозиготности по гену *white* (*w* – белые глаза) на одной половине тела (женской) глаз будет красным, а на другой (мужской) – белым. Такой тип гинандроморфа называют билатеральным (рис. 8.3). Проведя цитологическое исследование клеток разных половин

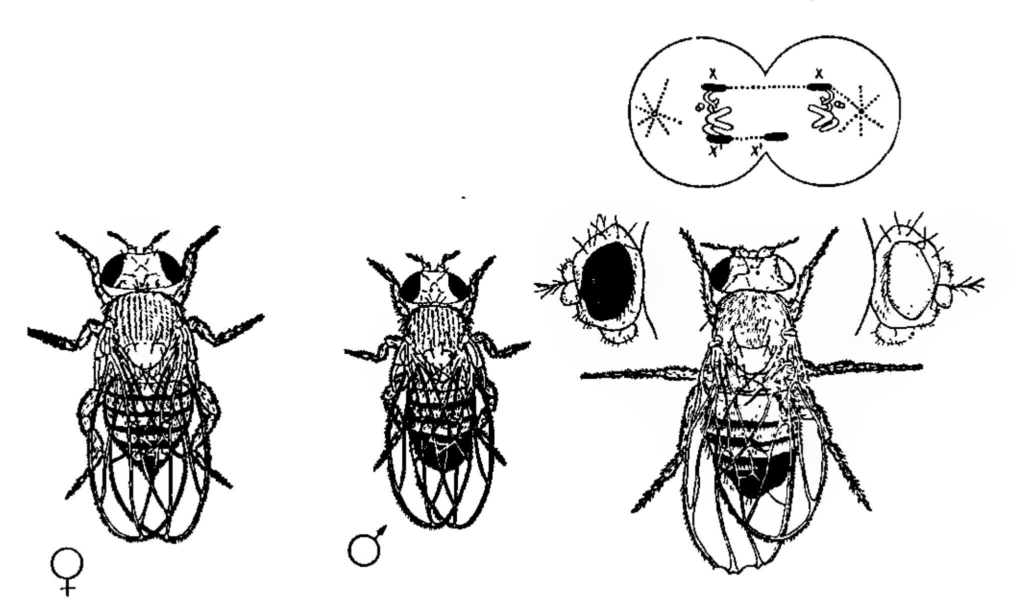


Рис. 8.3. *Drosophila melanogaster*. (Из: Лобашев, 1967)

а – внешний вид самца и самки Drosophila melanogaster, б – монозиготный гинандроморф дрозофилы; вверху – предполагаемая схема возникновения гинадроморфа путем элиминации одной из Х-хромосом

тела у такой дрозофилы, можно убедиться в наличии двух X-хромосом в клетках женской половины и одной X-хромосомы – в клетках мужской, что служит подтверждением связи детерминации пола у дрозофилы с числом X-хромосом. Логичным будет и заключение о том, что в детерминации пола у дрозофилы Y-хромосома не участвует, однако, как было показано в других исследованиях, ее присутствие обеспечивает фертильность самцов. Действительно, в дальнейшем было установлено, что Y-хромосома активируется у самцов дрозофилы на поздних этапах развития при формировании спермиев.

Если подобное распределение X-хромосом произойдет во время второго деления дробления зиготы, то признаки мужского пола будет иметь участок, составляющий четверть тела женской особи, и т.д. (чем позже в эмбриональном развитии произойдет утрата одной из X-хромосом в делящейся соматической клетке, тем меньшим окажется участок мужской ткани). Гинандроморфы, появляющиеся в результате такого дробления, принадлежат к мозаичному типу, и обнаружить их можно по мозаичному проявлению рецессивных маркеров, находящихся у гомогаметного пола в гетерозиготном состоянии.

Если в яйцеклетке образуются два женских пронуклеуса, каждый из которых содержит одну X-хромосому и гаплоидный набор аутосом, то в условиях полиспермии могут развиться дизиготные гинандроморфы. Один женский пронуклеус может быть оплодотворен сперматозоидом, несущим X-хромосому, а другой – Y-содержащим сперматозоидом. В результате половина клеток будет иметь набор половых хромосом XX, а другая половина – XY, что и приведет к развитию гинандроморфов. Такие особи были получены экспериментально сотрудниками Т. Моргана у самок дрозофилы, развившихся из яиц при полиспермии.

8.3.2. БАЛАНСОВАЯ ТЕОРИЯ К. БРИДЖЕСА

Исследуя в 1919–22 гг. характер половой дифференцировки у дрозофилы, К. Бриджес обнаружил триплоидных самок с набором хромосом 3X+3A, где 3A – число наборов аутосом. Некоторые из таких самок оказались плодовитыми и были скрещены с диплоидными самцами XY+2A. Потомство от этого скрещивания состояло из восьми типов особей с различным соотношением между числом X-хромосом и числом наборов аутосом (обозначено в дальнейшем как X/A), обусловленным нарушением нормального расхождения хромосом в мейозе у триплоидных самок. Морфологический, цитологический и генетический анализ этого потомства сыграл важную роль в раскрытии механизмов детерминации пола у дрозофилы.

К. Бриджес установил решающую роль соотношения между числом X-хромосом и числом наборов аутосом в детерминации пола (рис. 8.4). Оказалось, что при соотношении X/A равном 1 (2X/2A или 3X/3A), развиваются самки: соответственно нормальная (диплоидная) и триплоидная. Кроме того, фенотипически самками являются особи 2X+Y/2A, возникающие в результате оплодотворения яйцеклетки с двумя X-хромосомами спермием, несущим Y-хромосому. При X/A равном 0,5 (X+Y/2A или X/2A) независимо от присутствия или отсутствия Y-хромосомы развиваются самцы, но в отсутствие Y – стерильные. В случае, когда X/A имеет значение промежуточное

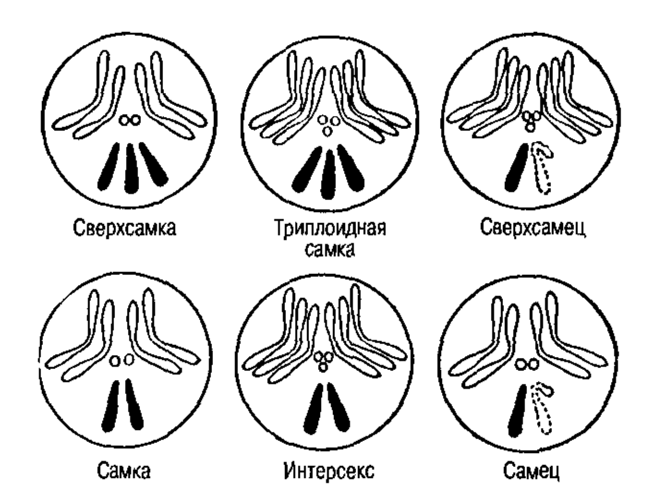


Рис. 8.4. Варианты баланса половых Х-хромосом (*черные*) и аутосом (*белые*) у дрозофилы. Пунктиром изображена Y-хромосома. (Из: Лобашев, 1967)

между 0,5 и 1 (у дрозофил 2Х/3А или 2Х+Y/3А), насекомые приобретают черты интерсексуальности, т.е. смешанного проявления мужских и женских половых признаков (рис. 8.5). Особи Х+Y/3А развиваются в так называемых «сверхсамцов». Они имеют гипертрофированные мужские признаки, но стерильны и быстро погибают. И, наконец, особи 3Х/2А представляют собой «сверхсамок» с аномально развитыми яичниками и также сниженной жизнеспособностью.

В 1925 г. эта концепция получила название **балансовой теории.** Согласно ее положениям, в отношении формирования пола организм является бипотенциальным, т.е. несет в себе задатки обоих полов. Интерсексуальность дрозофилы следствие бисексуальной природы ее организма. Степень интерсексуальности может зависеть, как показал К. Бриджес, от внешних факторов, например, температуры, сдвигаясь при ее повышении в сторону женских признаков, а при понижении – в сторону мужских. Оказалось возможным вывести путем отбора по характеру потомства линии, дающие преимущественно интерсексов мужского или женского типа.

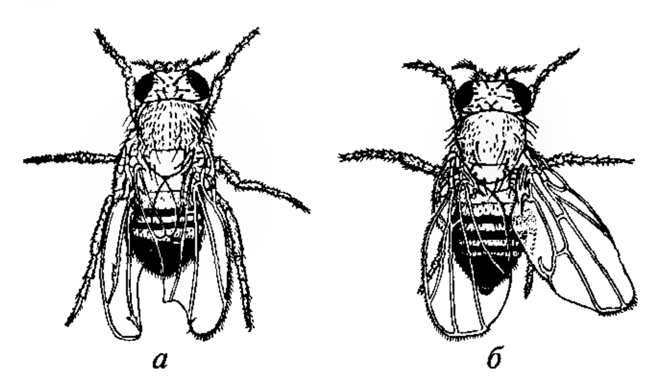


Рис. 8.5. Фенотип интерсексов у дрозофилы с хромосомной конституцией 2Х+3А. (Из: Дубинин, 1986)
а – интерсекс мужского типа, б – женского

Таким образом, у дрозофилы пол развивающейся зиготы генетически обусловлен соотношением числа аутосом и Х-хромосом. Дополнительные доказательства детерминирующего характера этого соотношения были получены в остроумных экспериментах на интерсексах 2Х/3А. Методом хромосомных перестроек, заключающихся в дуплици-

ровании (удвоении) участков хромосом, были получены особи, у которых кроме двух Х-хромосом, имелись дополнительные участки Х-хромосомы разной длины. По мере нарастания протяженности таких участков их носители-интерсексы становились все более похожими на самок.

8.3.3. ГЕНЫ, ИЗМЕНЯЮЩИЕ ПОЛ

Одно из первых прямых доказательств генетической детерминации пола было получено А. Стёртевантом: в 1945 г. им был открыт ген, изменяющий пол и влияющий на развитие первичных половых признаков. В одном из экспериментов по скрещиванию дрозофил наблюдалось не обычное расщепление по полу (50% самцов и 50% самок), а расщепление, в котором на 62,5% самцов приходилось 37,5% самок. А. Стёртевант показал, что этот феномен обусловлен аутосомным рецессивным геном *tra* (в схеме скрещивания он обозначен буквой *t* – трансформатор пола), локализованным в третьей хромосоме дрозофилы. В гомозиготном состоянии этот ген обусловливает развитие фенотипически нормальных, но стерильных самцов из зигот, имеющих две Х-хромосомы. Самец XY, гомозиготный по гену *t*, является плодовитым. Если нормальных самок (XX t^+t^+) скрещивают с самцами, гомозиготными по указанному гену (XY *tt*), то в первом поколении самки имеют генотип XX t^+t, а самцы – XY t^+t. В потомстве этих мух происходит следующее расщепление по полу:

ГАМЕТЫ самца / самки	Xt^+	Xt	Yt^+	Yt
Xt^+	XXt^+t^+ самка	XXt^+t самка	XYt^+t^+ самец	XYt^+t самец
Xt	XXt^+t самка	$XXtt$ стерильный самец	XYt^+t самец	$XYtt$ самец

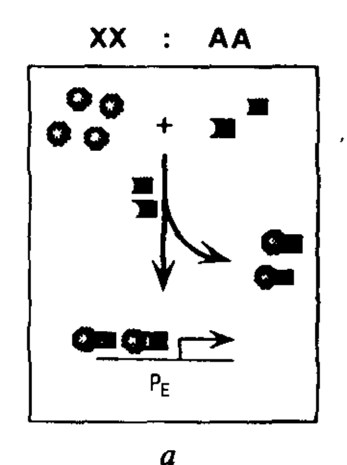
Другой пример генетически обусловленной трансформации пола был описан у наездника *Habrobracon juglandis*. Обычно оплодотворенные яйца развиваются в диплоидных самок, а неоплодотворенные – в самцов. Но иногда самцы появляются и из оплодотворенных яиц. Оказалось, что у *Habrobracon juglandis* имеется особый ген детерминации пола, и пол зависит от того, находятся ли аллели данного гена в гомо- или гетерозиготном состоянии. Этот ген представлен серией рецессивных аллелей (более 9): X_a, X_b, X_c и т.д. Самки всегда гетерозиготны по этим аллелям, и поскольку они диплоидны, то их генотипы будут: X_a/X_b, X_b/X_c, X_a/X_c и т.д. Диплоидные самцы, возникающие из оплодотворенных яиц, гомозиготны по одному из серии аллелей: X_a/X_a, X_b/X_b, X_c/X_c и т.д. Партеногенетические гаплоидные самцы гемизиготны. Если гетерозиготную самку X_a/X_b скрестить с самцом X_a, то в потомстве из оплодотворенных яиц будут развиваться самцы X_a/X_a и самки X_a/X_b. Из-за большого количества аллелей гена, детерминирующего пол у наездника, вероятность случайного образования диплоидного гомозиготного самца весьма мала. Большинство их вследствие причин аналогичных тем, что описаны для самцов-трутней у пчел, погибает еще на стадии личинки, а немногие выжившие оказываются бесплодными.

8.3.4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕТЕРМИНАЦИИ ПОЛА У ДРОЗОФИЛЫ

Семь десятилетий понадобилось генетикам, чтобы ответить на вопрос, какие именно молекулярные механизмы лежат в основе зависимости пола дрозофилы от баланса X-хромосом и аутосом. В настоящее время гены половой детерминации, идентифицированы; известно также, на каких этапах развития они проявляют свою активность. Показано, что пол у дрозофилы определяется генами: *Sex-lethal* (*Sxl*), *transformer* (*tra*), *transformer-2* (*tra-2*), *doublesex* (*dsx*) *M* и *F*, *intersex* (*ix*), *sisterless* (*sis*) *a* и *b*, *daughterless* (*da*).

Установлено, что многоступенчатый процесс половой детерминации начинается с образования комплекса из белковых продуктов генов *sis-a* и *sis-b*, расположенных в X-хромосоме, и аутосомного гена *da*. Такое различие в локализации названных генов и определяет дальнейшую специфику транскрипции ключевого в определении пола у дрозофилы гена *Sxl*. Количество продуктов генов *sis-a* и *sis-b* находится в прямой зависимости от числа X-хромосом у эмбриона: одна доза у особей X/2A и две — у 2X/2A. В то же время количество продукта гена *da* и у тех, и у других составляет две дозы вследствие одинакового числа аутосом у самцов и самок. Таким образом, в белковом комплексе sis/da названные компоненты находятся в соотношении 1:2 у эмбрионов X + Y/2A и 1:1 у эмбрионов 2X/2A. Именно этот белковый комплекс взаимодействует с регуляторным районом гена *Sxl*, в состав которого входят ранний (P_E) и поздний (P_L) промоторы, стимулирующие транскрипцию гена *Sxl*. Наличие большого числа комплексных молекул sis/da у эмбриона 2X/2A вызывает активацию раннего промотора (P_E) на стадии бластодермы, что в конечном итоге приводит к формированию фенотипа самки (рис. 8.6, *а*). У эмбрионов X+Y/2A и X/2A, имеющих в генотипе единственную X-хромосому, число комплексных молекул уменьшено вдвое, поэтому активация раннего промотора не происходит и ген *Sxl* не включается (рис. 8.6, *б*).

На следующих стадиях развития дрозофилы, при активации позднего промотора



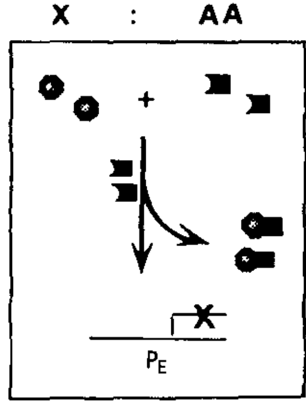


Рис. 8.6. Включение гена *Sxl* на ранних стадиях развития дрозофилы: *а* — у самки; *б* — у самца. (Из: Bopp, 2001)

Кружками обозначены суммарно продукты генов sis-a и sis-b, флажками - продукт гена da. P_E – ранний промотор гена Sxl

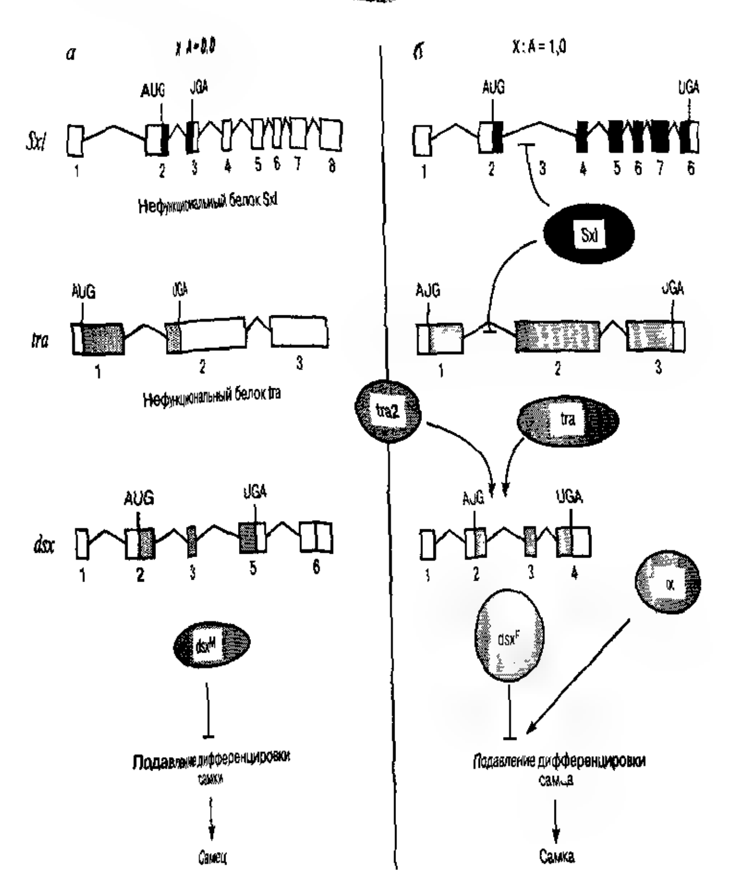


Рис. 8.7. Последовательные этапы взаимодействия генов в процессе детерминации пола у самцов (*а*) и самок (*б*) дрозофилы. (Из: Жимулев, 2001)

(P_L) продукт гена *Sxl*, содержащего 8 экзонов, взаимодействует поэтапно с генами *tra* и *dsx*. Результаты этого взаимодействия зависят от соотношения X/A. Так у эмбрионов 2X/2A ген *Sxl*, в его составе экзоны 1, 2, 4–8) кодирует функциональио полноценный белок. Он в свою очередь вступает во взаимодействие с геном *tra*, который в комплексе с продуктом гена *tra* 2 обеспечивает образование специфической для самок РНК гена *dsxF* Продукт этого типа вовлекает в цепь формирования пола дрозофилы еще один ген – *ix*. Именно за счет белковых продуктов генов *dsxF* и *ix* на заключительных этапах инактивируются многие гены, которые могли бы репрессировать формирование фенотипа самки (рис. 8.7).

Напротив, у эмбрионов X + Y/2A в ходе образования первичного транскрипта гена *Sxl* вслед за экзонами 1 и 2 считывется экзон 3, на котором последующая трансляция заканчивается из-за большого числа входящих в его состав стоп-кадров UGA. Усеченный продукт гена *Sxl* обусловливает специфическое считывание гена *tra*, в результате чего белок tra тоже оказывается нефункциональным. Это событие опреде-

ляет сразу два момента в детерминации пола: при отсутствии функционального продукта *tra*-гена не синтезируется и полноценный продукт гена *tra* 2, а кроме того, в этих условиях с альтернативного набора экзонов гена *dsx* считывается белок dsxM, репрессирующий развитие самок (см. рис. 8.7). В результате формируются особи с фенотипом самца. Целый ряд белков у дрозофилы присущ особям одного пола и не синтезируется у другого. Так, например, для самок характерно наличие специфических белков желтка и яйцевой оболочки (хориона).

Таким образом, в каскад строго иерархических взаимодействий, определяющих детерминацию пола у дрозофилы, вовлечены гены, локализованные как на Х-хромосоме, так и на аутосомах. Последовательная активация либо репрессия этих компонентов каскада в значительной степени обеспечивается альтернативным сплайсингом первичных РНК-транскриптов.

8.4. ХРОМОСОМНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПЕРВИЧНОЙ ДЕТЕРМИНАЦИИ ПОЛА У ЧЕЛОВЕКА

Детерминация пола у человека контролируется целым рядом генов, локализованных как на половых хромосомах, так и на аутосомах. Чрезвычайно важно, что зачатки гонад у эмбриона (называемые половыми валиками) до шестинедельного возраста развиваются как индифферентные, т.е. бипотенциальные образования. Первичные половые клетки (гоноциты), выявляемые у эмбриона с 14-го дня развития, мигрируют через энтодерму желточного мешка в область будущих зачатков гонад и в результате митотического деления формируют там пул половых клеток. Для начальных этапов развития гонады наличие в ней гоноцитов не является строго обязательным; от наличия или отсутствия первичных половых клеток не зависит также окончательная дифференцировка гонад по мужскому типу. Но завершенная дифференцировка яичников при отсутствии первичных половых клеток либо нарушена, либо вовсе не происходит. Результатом первичной детерминации пола является формирование из недифференцированной ткани гонады либо яичек, либо яичников, причем и тот, и другой процесс активно контролируется группой генов, кодирующих транскрипционные факторы.

8.4.1. РОЛЬ Y-ХРОМОСОМЫ В ДЕТЕРМИНАЦИИ ПОЛА

Решающую роль в становлении пола у человека, как и вообще у всех млекопитающих, играет Y-хромосома: в случае ее отсутствия или отсутствия в ее составе детерминирующих пол генов дальнейшая дифференцировка происходит по женскому пути независимо от числа Х-хромосом.

Y-хромосома человека (рис. 8.8) содержит всего лишь 1,6% ДНК гаплоидного генома, тем не менее к настоящему времени на ней идентифицированы 92 гена, характеризующихся **голандрическим типом наследования**. Моногенные заболевания человека с установленным фактом прямой передачи признака от отца к сыну описаны в части II. **Медицинская генетика.** Из всей совокупности Y-хромосомных генов пока лишь для отдельных представителей выявлены те звенья формирования и функционирования мужской репродуктивной системы, которые детерминируются ими. Один из наиболее изученных генов Y-хромосомы человека — локализованный в дистальной части ее короткого плеча (Yp11.31-32), однокопийный ген *SRY* (от англ. *sex-determining region Y*). Известно, что длина этого гена – 1 т.п.н., он не содержит интронных последовательностей, в его составе есть GC-богатая промоторная область длиной 310 п.н. и открытая рамка считывания из 612 п.н. Ген *SRY* млекопитающих кодирует белок (транскрипционный фактор из 204 аминокислот), который имеет ДНК-связывающий домен с консервативным участком из 79 аминокислотных остатков. Этот участок, так называемый *HMG*-бокс (от англ. *high mobility group*), может специфически связываться с регуляторными последовательностями ДНК (в частности, в области промоторов генов, детерминирующих половую дифференцировку), что вызывает изгиб молекулы. Такие изменения, происходящие в сайтах, являющихся мишенями для *SRY*, облегчают связывание транскрипционных регуляторов в непосредственно прилегающих областях. Пока точно не установлены гены, транскрипция которых регулируется *SRY*, достоверно известно лишь, что распознающий его сайт есть в промоторе гена *AMH* (от англ. *anti-mullerian hormone*).

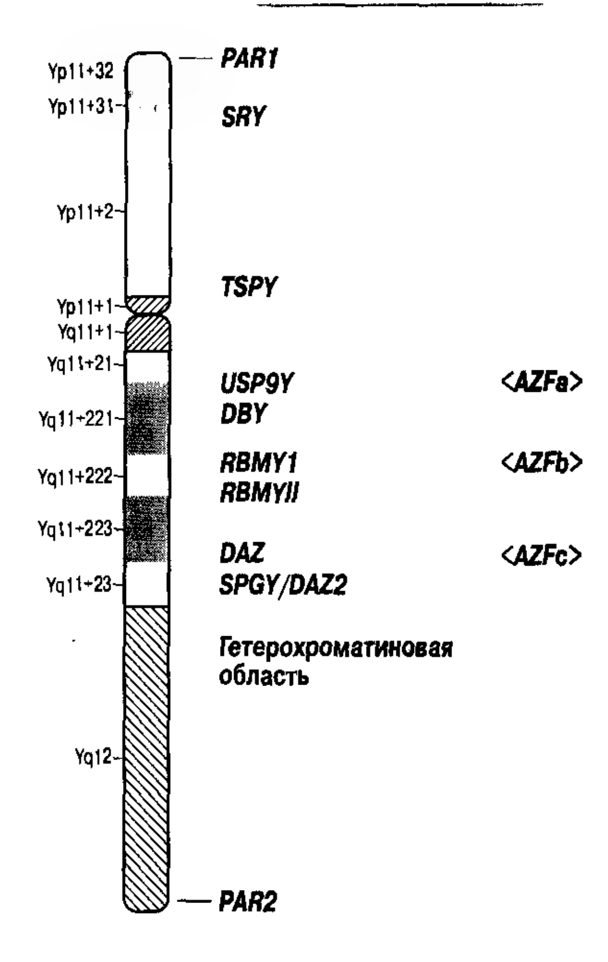


Рис. 8.8. Схема Y-хромосомы. (По: GenBank, 2003)

Экспериментально показано, что именно ген *SRY* играет роль тестис-определяющего фактора *TDF* (от англ. *testis-determining factor*). У человека его экспрессия обнаруживается уже на стадии зиготы, у мыши – на 10,5 день после оплодотворения. Ген

ожет быть делетирован (утрачен) или транслоцирован (перемещен) с Y- на X- или ›угую хромосому в профазе мейоза, в результате чего в потомстве появятся XY-енщины или XX-мужчины. Для последних характерен мужской фенотип при жен-ком кариотипе (46,XX) и различные пороки развития: гипоплазия яичек, нарушения перматогенеза, гинекомастия (развитие молочных желез по женскому типу). У XY-енщин наблюдается дисгенезия гонад, гипоплазия внутренних половых органов, а кже феминизация пропорций тела вообще и наружных гениталий в частности.

Локусу *AZF* (от англ. *azoospermia factor*), расположенному в длинном плече Y-хро-›сомы (Yq11), принадлежит значительная роль в генетической регуляции сперма-›генеза у человека. Мутации генов этого локуса: *AZFa*, *AZFb* и *AZFc* приводят к на-шению сперматогенеза от снижения его активности (*олигозооспермия*) до полного сутствия (*азооспермия*).

В длинном плече Y-хромосомы картирован ген, контролирующий продукцию лка клеточных мембран — *H-Y*-антиген гистосовместимости. Ранее и его считали авным фактором дифференцировки пола у человека, так как он репрессирован у ин-видов, не имеющих в кариотипе Y-хромосомы. В настоящее время появились дан-ые, ставящие под сомнение роль *H-Y*-антигена в формировании мужских гонад.

8.4.2. РОЛЬ АУТОСОМНЫХ ГЕНОВ В ДЕТЕРМИНАЦИИ ПОЛА

›оме генов Y-хромосомы, в первичной детерминации пола у человека прямо или свенно участвуют X-хромосомные и аутосомные гены. В настоящее время таких юв известно уже несколько десятков. Среди них можно выделить:

1) гены, детерминирующие развитие яичка;

2) гены, детерминирующие развитие яичника.

Помимо описанного выше гена *SRY* к первой группе относится родственный ему і *SOX9* (от англ. *SRY-related HMG-box-containing gene*), который картирован в длин-м плече хромосомы 17 в локусе (q24-q25). Экспрессию гена *SOX9* обнаруживают в ловом валике эмбриона еще до стадии дифференцировки гонад. Ген *SRY* гомоло-чен представителям семейства *SOX* (*SRY-related HMG-box-containing genes*) из 30-ти юв, кодирующих белки, которые имеют гомологию в ДНК-связывающем домене.

Единственный представитель второй группы – ген *DAX1* (*DSS AHC* критиче-ий район хромосомы X: *dosage-sensitive sex reversal – adrenal hypoplasia congenita*). от ген, содержащий два экзона, картирован в DSS-локусе короткого плеча X-хро-сомы (p21.2-.3). Предполагалось, что именно *DAX1* детерминирует развитие яич-ков и в норме репрессируется у мужчин, (начало его экспрессии совпадает с акти-цией гена *SRY*, но в дифференцирующихся яичках уровень экспрессии *DAX1* пада-тогда как в развивающихся яичниках, напротив, сохраняется). Однако в послед-: время предположение относительно роли гена *DAX1* в дифференцировке пола двергается сомнению.

Отдельную группу составляют главные гены, регулирующие транскрипцию в хо-дифференцировки клеток, которые участвуют в морфогенезе гонад: *WT1*, *LIM1*, *1* и *GATA4* (действие первых двух генов может быть отнесено к процессу первич-й детерминации пола).

Ген *WT1* (от англ. *Wilm's tumor-associated gene 1*), картированный в коротком плече хромосомы 11 в локусе p13, состоит из 10 экзонов и кодирует 16 основных изоформ белка. *WT1* регулирует транскрипцию на разных уровнях, действуя либо как активатор, либо как коактиватор, либо как репрессор. Показано, что ген *WT1* необходим на ранней, бипотенциальной стадии дифференцировки гонад: его экспрессия обнаружена до стадии активации гена *SRY*. Мыши с «выключенным» геном *WT1* нежизнеспособны, при аутопсии у них установлено отсутствие и почек, и гонад.

Для ранних этапов половой дифференцировки чрезвычайно важна и экспрессия гена *LIM1*. Это подтверждается экспериментальными данными на модельных животных. Последствия выпадения его функции у мышей те же, что и для гена *WT1*.

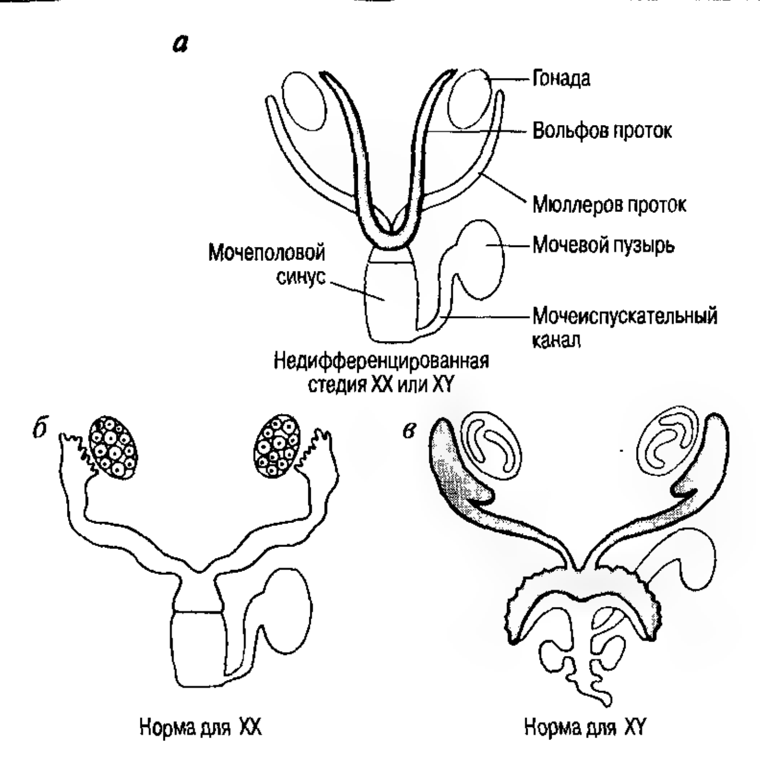
Что касается генов *SF1* и *GATA4*, то, согласно современным представлениям, их действие – важный этап вторичной половой детерминации.

8.5. ВТОРИЧНАЯ ДЕТЕРМИНАЦИЯ ПОЛА У ЧЕЛОВЕКА

Описанные выше процессы приводят к тому, что гонады эмбриона, начиная с шестинедельного возраста, дифференцируются по полу, что подтверждено гистологически. Тем не менее, этого еще недостаточно для развития женского или мужского фенотипа. Вторичная детерминация пола обусловлена гормонами, которые вырабатывают яичники и яички.

До начала половой дифференцировки, на стадии индифферентных гонад, выводящая система эмбриона представлена двумя типами протоков: вольфовыми и мюллеровыми, происходящими из первичной почки, закладка которой относится к 3–4 неделе эмбрионального развития (рис. 8.9, *а*). При развитии эмбриона женского пола мюллеровы протоки преобразуются в фаллопиевы трубы, матку и верхнюю треть влагалища, а вольфовы – атрофируются. При развитии эмбриона мужского пола имеют место обратные события: редуцируются мюллеровы протоки, а из вольфовых формируются семенные протоки и семенные пузырьки. Зачатки наружных половых органов начинают обособляться на пятой неделе эмбриогенеза, проходя сначала недифференцированную стадию, по строению достаточно близкую к женским половым органам. Детерминирующим началом развития мужского фенотипа являются два гормона: антимюллеров и тестостерон.

Антимюллеров гормон (АМН), или MIS-фактор (от англ. *mullerian inhibiting substance*) вызывает регрессию мюллеровых протоков (рис. 8.9, *в*). В отсутствие АМН мюллеровы протоки, как уже указывалось выше, развиваются в матку, маточные трубы и верхнюю треть влагалища (рис. 8.9, *б*). Установлено, что действие различных активаторов экспрессии гена *AMH* потенцируется действием гена *GATA4*, являющегося членом семейства транскрипционных регуляторных факторов. Секреция АМН начинается на седьмой неделе эмбрионального развития и продолжается до пубертатного периода, а затем резко падает, но низкий уровень экспрессии MIS-фактора мо-



с. 8.9. Роль тестостерона во вторичной половой детерминации. (Из: Айала и Кайгер, 38)

г сохраняться и у взрослых. Предполагают, что он играет важную роль в развитии iek, созревании сперматозоидов и ингибировании роста опухолевых клеток. Ген 'H картирован в коротком плече хромосомы 19 (локус p13.2-.3). Он содержит 5 эк-юв, кодирующих гликопротеин – белок, состоящий из 560 аминокислот. АМН зывается со специфическим рецепторным комплексом и активирует его. Промо-гена *АМН* содержит *SRY*-распознающий сайт, с которым связывается консенсус-*SRY*-последовательность ААСААТ/А.

Под контролем другого гормона (андрогена) – **тестостерона** в ходе вторичной де-минации из вольфовых протоков формируются мужские внутренние половые токи: средняя часть протоков удлиняется и преобразуется в семявыносящие альцы. Кроме того, под влиянием тестостерона индуцируется развитие семенных ырьков и придатка яичка (эпидидимиса). В мочеполовом синусе тестостерон пре-щается в 5α-дегидротестостерон, при участии которого формируются наружные овые органы: половой член, простата и мошонка. Оба гормона оказывают как ме-ое, так и общее воздействие, маскулинизируя экстрагенитальные ткани-мишени бусловливая половой диморфизм центральной нервной системы, внутренних ор-ов и размеров тела. В случае нарушения биосинтеза андрогенов развиваются от-нения от нормального мужского фенотипа, степень которых может варьировать легкой гипоспадии (низко расположенного наружного отверстия мочеиспуска-ного канала) и/или крипторхизма до выраженного женского фенотипа. Сущест-

венно, что для нормального развития мужских половых органов необходим не только достаточный уровень андрогенов, но и нормально функционирующие андрогеновые рецепторы. В отсутствие рецепторов развиваются различные варианты так называемого *синдрома нечувствительности к андрогенам* (*AIS*). Андрогеновый рецептор кодируется геном *AR*, локализованным в Х-хромосоме в локусе q11. В его восьми экзонах обнаружено более 200 различных мутаций, среди которых наиболее часто встречаются точковые. Замена даже одного нуклеотида может приводить к серьезному нарушению функции андрогенового рецептора вплоть до полной его инактивации.

Активация в клетках Лейдига биосинтеза тестостерона, необходимого для дифференцировки органов половой системы по мужскому типу происходит под действием транскрипционного активатора, кодируемого геном *SF1* (от англ. *steroidogenic factor 1*), который локализован в длинном плече хромосомы 9 (9q33). Кроме того, предполагается, что ген *SF1* регулирует экспрессию гена *DAX1*, так как в промоторе последнего обнаружен распознающий *SF1*-сайт, т.е. по отношению к *DAX1* ген *SF1* выступает в качестве «вышестоящего». В свою очередь *DAX1* может быть супрессором в отношении гена *SF1*. Возможно, в процессе морфогенеза яичников ген *DAX1* предотвращает транскрипцию гена *SOX9* через репрессию транскрипции гена *SF1*. Имеющиеся данные говорят о детерминирующей роли гена *SF1* в дифференцировке эндокринных органов, регулирующее действие которых на морфогенез половой системы начинается после завершения ранних этапов дифференцировки гонад.

Кроме описанных выше гормонов, во вторичной детерминации пола у млекопитающих и, в частности, у человека, важную роль играют эстрогены и их рецепторы. Нормальная функция эстрогенов необходима для формирования репродуктивной системы как у женщин, так и у мужчин. Причем у последних эстрогены участвуют в созревании костной ткани и обеспечении определенных качественных показателей сперматозоидов. «Выключение» эстрогеновых рецепторов вызывает у модельных животных (мышей) гипоплазию матки и яичников в сочетании с развитием бесплодия.

Таким образом, в окончательном формировании наружных гениталий решающую роль играют андрогены – мужские половые гормоны, продуцирующиеся в надпочечниках и в яичках. Если их влияние отсутствует либо недостаточно, наружные половые органы формируются по женскому типу независимо от наличия или отсутствия эстрогенов.

Количество уже сейчас известных генов, вовлеченных в развитие и функционирование органов репродуктивной системы, чрезвычайно велико. Для яичка (как и для простаты) оно составляет более 1200, для яичника – более 500, для матки – более 1800 генов. Анализ функциональных взаимоотношений даже небольшой части наследственных детерминант, включенных в формирование пола у человека, позволяет получить представление о многоплановом их взаимодействии в данном процессе (рис. 8.10), который нельзя представить как цепь последовательных событий, подобную описанной выше у дрозофилы. По мнению ряда исследователей, процесс взаимодействия генетических регуляторов половой дифференцировки у человека, скорее всего, можно сравнить с сетью, где действие всех генов взаимосвязано и взаимообусловлено.

Рассматривая проблемы детерминации пола у человека, мы затронули лишь надводную часть «айсберга», каковым представляется чрезвычайно сложный процесс становления пола. Он может быть продемонстрирован схемой уровней дифференцировки пола, предложенной в 1990 г. Г.С. Васильченко:

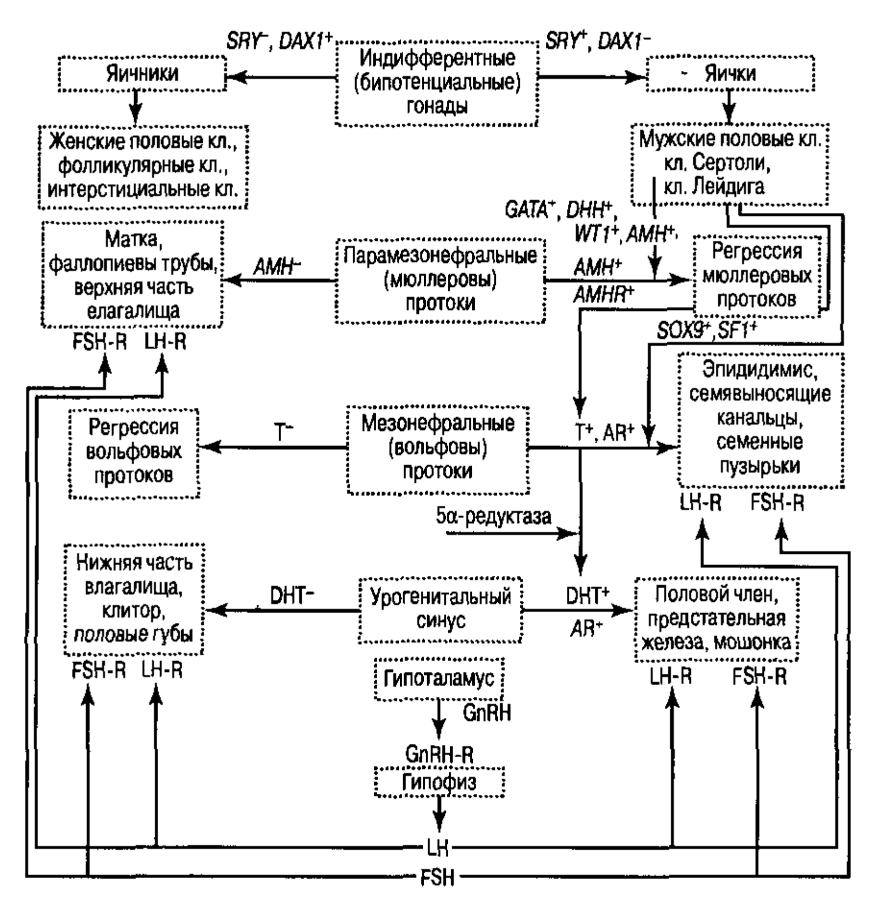
ПОЛ

	ГЕНЕТИЧЕСКИЙ – ГЕНОТИП	**XX**
іки	**ГОНАДНЫЙ**	**Яичники**
рматозоиды	**ГАМЕТНЫЙ**	**Яйцеклетки**
ротены	**ГОРМОНАЛЬНЫЙ**	**Эстрогены**
жской	**МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ (соматический) – ФЕНОТИП**	**Женский**
жской	**ГРАЖДАНСКИЙ**	**Женский**

ПОЛ ВОСПИТАНИЯ

ПОЛОВАЯ САМОИДЕНТИФИКАЦИЯ

ПОЛОВАЯ РОЛЬ, ВЫБОР СЕКСУАЛЬНОГО ПАРТНЁРА



. **8.10.** Морфогенетическая дифференцировка половой системы человека. (Из: Чер-
. Курило, 2001)

DAX1, SOX9, GATA4, DHH, WT1, SF1, AMH, AMHR – гены, участвующие в дифференциров-
ıнад и морфогенезе половой системы.

IT, AR, GnRH, GnRH-R, LH, LH-R, FSH, FSH-R гормоны и рецепторы к ним, участвующие в
ональной регуляции дифференцировки пола

Нарушение процесса формирования каждого из обозначенных уровней может стать у человека причиной отклонений в становлении половой идентичности.

8.6. ЗАВИСИМЫЕ ОТ ПОЛА И ОГРАНИЧЕННЫЕ ПОЛОМ ПРИЗНАКИ

Поскольку генотип всегда выступает как единая, целостная система, то взаимодействие генов, контролирующих механизм дифференцировки пола и иные функции организма, наблюдается нередко. Одним из примеров такого взаимодействия служат признаки, зависимые в своем проявлении от пола и ограниченные полом. Гены, контролирующие такие признаки, могут находиться как в половых хромосомах, так и в любой из аутосом, и проявляются только у одного пола или имеют разную степень проявления у особей противоположного пола.

Например, ген раннего облысения имеет различное проявление у мужчин и женщин. У мужчин этот ген действует как доминантный, у женщин – как рецессивный, поэтому гетерозиготные женщины не проявляют данного признака, а в гомозиготном состоянии он выражен у женщин слабее, чем у мужчин. Высокий уровень мужских половых гормонов определяет доминирование гена рогатости у самцов-баранов, в то время как у самок доминирует ген комолости. Еще одним примером зависимости проявления от пола может служить аутосомный доминантный ген, вызывающий у самцов аквариумной рыбки (сиамского петушка) развитие больших плавников. У самок этот ген не проявляется.

Проявление генов, ограниченных полом, всегда необходимо рассматривать в контексте реализации генотипа как системы в условиях сложного организма высших животных. Помимо генов, ответственных за развитие вторичных половых признаков, которые в норме проявляются только у одного из полов, а у другого могут присутствовать, но не экспрессируются, функциональную активность целого ряда других генов определяет гормональный профиль организма. Так, у быков есть гены, контролирующие продукцию молока и его качественные особенности (жирность, содержание белка и др.), но у быков и их сыновей эти гены «молчат», функционируют они только у их дочерей. Гены, определяющие различия пород по яйценоскости есть как у кур, так и у петухов, но проявляются они естественно только у самок. Какие из генов есть в наличии у самца можно предполагать только по продуктивности его женских предков и потомков.

8.7. ПОЛ И РАЗМНОЖЕНИЕ У ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

В начале этой главы, уже говорилось о том, что половой диморфизм – основа для воспроизводства потомства. Особь развивается из половой клетки, обладающей по-

ПОЛ

ХУ	**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ – ГЕНОТИП**	**XX**
Яички	**ГОНАДНЫЙ**	**Яичники**
Сперматозоиды	**ГАМЕТНЫЙ**	**Яйцеклетки**
Андрогены	**ГОРМОНАЛЬНЫЙ**	**Эстрогены**
Мужской	**МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ (соматический) – ФЕНОТИП**	**Женский**
Мужской	**ГРАЖДАНСКИЙ**	**Женский**

ПОЛ ВОСПИТАНИЯ

ПОЛОВАЯ САМОИДЕНТИФИКАЦИЯ

ПОЛОВАЯ РОЛЬ, ВЫБОР СЕКСУАЛЬНОГО ПАРТНЁРА

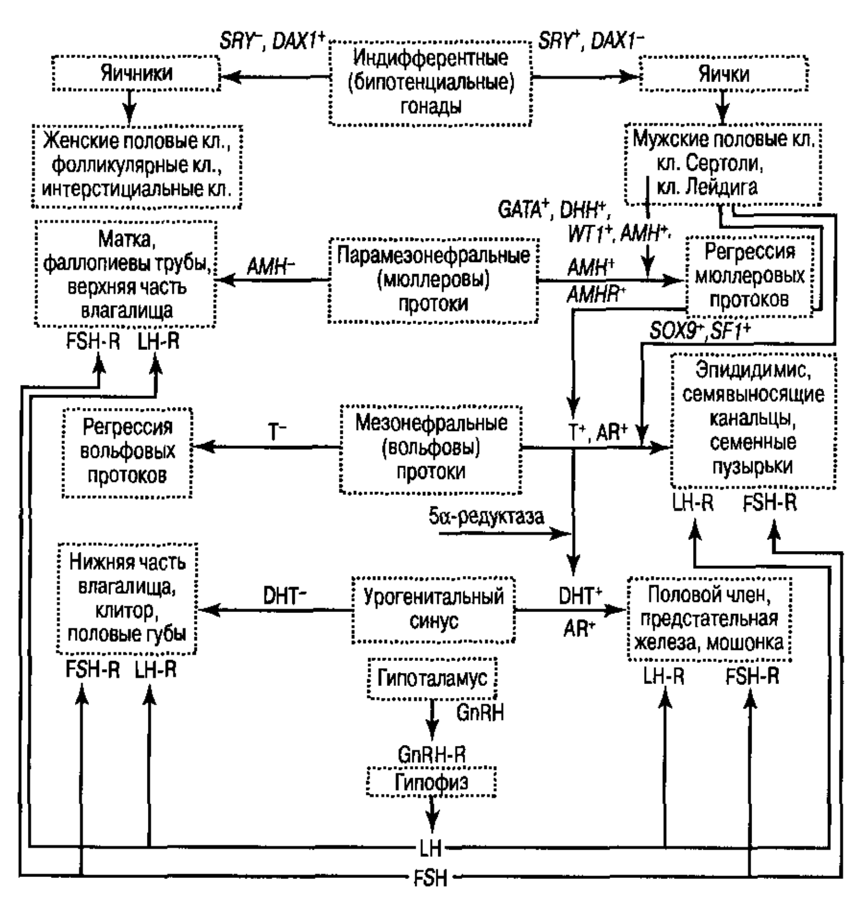


Рис. 8.10. Морфогенетическая дифференцировка половой системы человека. (Из: Черных, Курило, 2001)

SRY, DAX1, SOX9, GATA4, DHH, WT1, SF1, AMH, AMHR – гены, участвующие в дифференцировке гонад и морфогенезе половой системы.

T, DHT, AR, GnRH, GnRH-R, LH, LH-R, FSH, FSH-R – гормоны и рецепторы к ним, участвующие в гормональной регуляции дифференцировки пола.

Нарушение процесса формирования каждого из обозначенных уровней может стать у человека причиной отклонений в становлении половой идентичности.

8.6. ЗАВИСИМЫЕ ОТ ПОЛА И ОГРАНИЧЕННЫЕ ПОЛОМ ПРИЗНАКИ

Поскольку генотип всегда выступает как единая, целостная система, то взаимодействие генов, контролирующих механизм дифференцировки пола и иные функции организма, наблюдается нередко. Одним из примеров такого взаимодействия служат признаки, зависимые в своем проявлении от пола и ограниченные полом. Гены, контролирующие такие признаки, могут находиться как в половых хромосомах, так и в любой из аутосом, и проявляются только у одного пола или имеют разную степень проявления у особей противоположного пола.

Например, ген раннего облысения имеет различное проявление у мужчин и женщин. У мужчин этот ген действует как доминантный, у женщин – как рецессивный, поэтому гетерозиготные женщины не проявляют данного признака, а в гомозиготном состоянии он выражен у женщин слабее, чем у мужчин. Высокий уровень мужских половых гормонов определяет доминирование гена рогатости у самцов-баранов, в то время как у самок доминирует ген комолости. Еще одним примером зависимости проявления от пола может служить аутосомный доминантный ген, вызывающий у самцов аквариумной рыбки (сиамского петушка) развитие больших плавников. У самок этот ген не проявляется.

Проявление генов, ограниченных полом, всегда необходимо рассматривать в контексте реализации генотипа как системы в условиях сложного организма высших животных. Помимо генов, ответственных за развитие вторичных половых признаков, которые в норме проявляются только у одного из полов, а у другого могут присутствовать, но не экспрессируются, функциональную активность целого ряда других генов определяет гормональный профиль организма. Так, у быков есть гены, контролирующие продукцию молока и его качественные особенности (жирность, содержание белка и др.), но у быков и их сыновей эти гены «молчат», функционируют они только у их дочерей. Гены, определяющие различия пород по яйценоскости есть как у кур, так и у петухов, но проявляются они естественно только у самок. Какие из генов есть в наличии у самца можно предполагать только по продуктивности его женских предков и потомков.

8.7. ПОЛ И РАЗМНОЖЕНИЕ У ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

В начале этой главы, уже говорилось о том, что половой диморфизм – основа для воспроизводства потомства. Особь развивается из половой клетки, обладающей по-

нцией к формированию новых половых клеток и множества соматических клеток. икл полового размножения охватывает период от момента появления первичных ловых клеток до их образования в следующем поколении. У большинства видов ивотных и растений в процессе полового размножения происходит слияние муж- ой и женской гамет, причем строго внутривидовое. Одним из главных механизмов, еспечивающих этот феномен, является точное соответствие числа и архитектони- хромосом женских и мужских половых клеток, а также сродство цитоплазмы яй- клетки и ядра сперматозоида.

Партеногенез — тип полового размножения, при котором женские половые клет- развиваются без оплодотворения. Для ряда видов партеногенез — нормальное яв- ние (например, для низших ракообразных, коловраток, перепончатокрылых), но огда у видов, обычное размножение которых связано с оплодотворением, отдель- е яйцеклетки начинают развиваться партеногенетически. Партеногенез обеспечи- т воспроизводство при редких контактах разнополых особей и возможность резкого личения численности. У некоторых насекомых и ракообразных известен также ли- ночный партеногенез (педогенез), который служит механизмом, компенсирующим достаточную плодовитость взрослых особей.

Выделяют следующие естественные формы партеногенеза:

1) *амфитокия* (дейтеротокия) из неоплодотворенных яиц развиваются особи оих полов (известна у некоторых тлей);

2) *арренотокия* — неоплодотворенные яйца развиваются только в самцов, а для никновения самок необходимо оплодотворение (встречается у видов с гаплоид- диплоидным определением пола – перепончатокрылых насекомых и некоторых листоногих);

3) *телитокия* из неоплодотворенных яиц развиваются только самки (характерна для оторых тлей, а также ящериц). Во всех случаях телетокия контролируется внутрикле- ными эндосимбионтами, которые обусловливают нежизнеспособность самцов.

Как единственная форма размножения партеногенез практически не существует, как он либо чередуется с половым размножением, либо является принадлежно- ю отдельных рас. Из позвоночных естественный партеногенез характерен только пресмыкающихся и индеек. Известно, что до 40% отложенных индейками неоп- отворенных яиц могут начать развиваться, но только в редких, единичных случа- что развитие доходит до конца. Все выведенные таким способом птенцы оказыва- я самцами. Партеногенез у индеек, скорее всего, представляет собой отклонение нормального размножения посредством оплодотворения. В отличие от них, у трех ящерицы *Lacerta saxicola*, состоящих из одних самок, партеногенез представляет со- естественный способ размножения.

В 1886 г. русский зоолог А.А. Тихомиров показал, что обрабатывая яйца морского хлороформом или стрихнином, можно стимулировать начальные стадии их раз- ия; более того, воздействуя раствором серной кислоты на яйца шелкопряда, ему рвые удалось вызвать искусственный партеногенез. В дальнейшем именно этот ект был использован выдающимся отечественным генетиком Б.Л. Астауровым разработки эффективной технологии партеногенетического размножения шел- ряда в производственных условиях. В соответствии с данной технологией, не шедшие мейоз и неоплодотворенные яйца подвергают короткому нагреванию до

46 °С, одновременно активируя и диплоидизируя их (нет редукционного деления и кроссинговера, и яйца содержат обе половые хромосомы гетерогаметной матери – ZW). Потомство состоит из одних самок. Этот метод амейотического партеногенеза, разработанный в 40-е гг., представляет ценность тем, что потомки в точности воспроизводят генотип матери, и можно быстро и в большом количестве размножать ценный линейный материал.

Такой амейотический партеногенез наблюдается у реснитчатых и круглых червей, коловраток, моллюсков, некоторых видов насекомых, у карпа *Carassius auratus gibelio*.

Для практического шелководства наиболее выгодным является получение только самцов, так как из их коконов выходит более длинная шелковая нить. Получение чисто мужского потомства у тутового шелкопряда достигается с помощью экспериментального андрогенеза (термин предложен М. Ферворном в 1892 г.). **Андрогенез** – развитие организма из яйца с инактивированным ядром, оплодотворенного нормальным спермием, по сути – мужской партеногенез; в природе встречается редко (у некоторых растений и перепончатокрылых насекомых), искусственный андрогенез применяется в селекционно-генетических целях. Таким образом, Б.Л. Астауров, вместе со своими сотрудниками разработал способ регуляции пола потомства, одновре́менно позволяющий с большой точностью исследовать взаимоотношения ядра и цитоплазмы в генетических процессах (рис. 8.11).

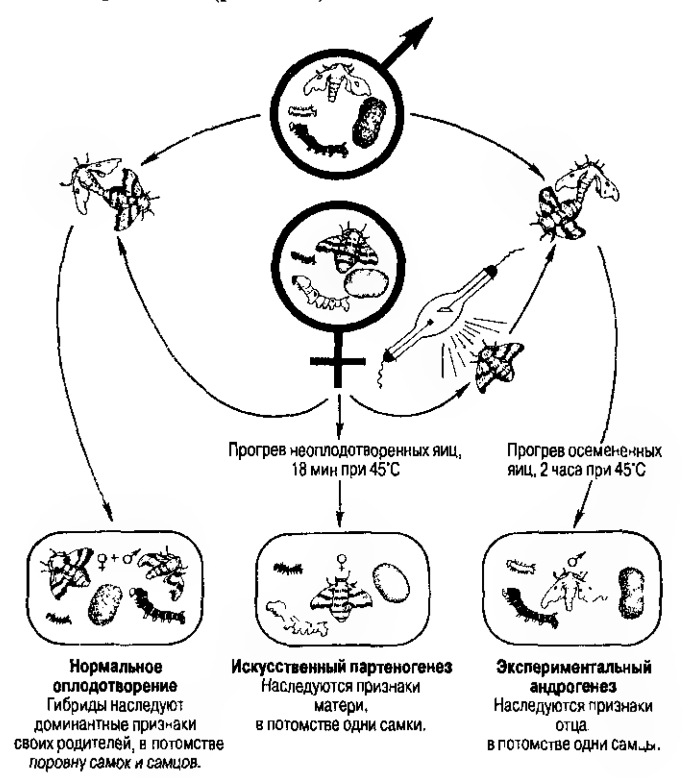


Рис. 8.11. Схема получения потомства желаемого пола у тутового шелкопряда. (Из: Гершензон, 1983)

В.А. Струнников разработал метод мейотического партеногенеза, при котором мей- протекает нормально, а двухчасовым снижением температуры до –(5–11) °С стимулируется развитие неоплодотворенных яиц и диплоидизация во время первого деления. В результате партеногенетическое потомство состоит из одних самцов.

Таким образом, кроме амейотического механизма диплоидизации при партеногенезе, существует мейотический, который, как показано в целом ряде исследований, представлен несколькими вариантами. Диплоидная яйцеклетка может образоваться:

1) *при сохранении конъюгации гомологов и кроссинговера, но при отсутствии редукционного деления*. Такой способ размножения присущ малому числу партеногенетически размножающихся видов, среди которых в основном — насекомые. В эту же группу должны быть включены спонтанные триплоиды у земноводных и человека;

2) *при отсутствии эквационного деления*. Эта группа более многочисленна и представлена как видами, способными к случайному партеногенезу или дающими редкое триплоидное потомство (включая мышей, крыс и человека), так и размножающимися партеногенетически или гиногенетически. **Гиногенез** — форма партеногенеза, при которой спермий не сливается с женским пронуклеусом, а лишь проникает в яйцеклетку и стимулирует ее дробление (известен у некоторых круглых червей, рыб, земноводных и многих покрытосеменных растений). В случае естественного гиногенеза число хромосом у развивающихся особей нормальное, диплоидное. Но искусственный гиногенез часто связан гаплоидией, что приводит к снижению жизнеспособности зародышей;

3) *при слиянии двух гаплоидных ядер*: либо гаплоидного пронуклеуса с ядром второго направительного тельца, либо ядра первого направительного тельца с женским пронуклеусом. Существенно, что невозможно различить в эксперименте: отсутствие редукционного деления при наличии кроссинговера (1) и слияние пронуклеуса с ядром первого направительного тельца, а также отсутствие эквационного деления (2) и слияние пронуклеуса с ядром второго направительного тельца;

4) *при удвоении хромосом гаплоидного пронуклеуса*. Процесс приводит к гомозиготности потомства по всем локусам, что, по-видимому, и является причиной весьма ограниченной распространенности этого механизма у партеногенетических видов;

5) *из клеток, в которых произошло премейотическое удвоение, не сопровождающееся цитокинезом*. Такое удвоение может привести либо к образованию двуядерного ооцита (например, у лягушек), либо — к формированию тетраплоидного ядра ооцита (например, у планарий).

В настоящее время показано, что искусственный партеногенез возможен практически у всех видов животных, необходим только соответствующий подбор факторов и условий, стимулирующих диплоидность их яйцеклеток. Однако млекопитающие — единственный класс позвоночных, который вследствие геномного импринтинга (см. гл. 22) имеет функциональные различия материнского и отцовского геномов. Результатом этого феномена является ранняя гибель искусственно полученных партеногенетических эмбрионов. Так, в эксперименте было установлено, что диплоидные партеногенетические эмбрионы мышей погибают на преимплантационных стадиях развития или вскоре после имплантации. С помощью трансформирующего ростового фактора удается пролонгировать развитие партеногенетических эмбрионов и на постимплантационных стадиях.

глава

РЕПЛИКАЦИЯ ДНК И ХРОМОСОМ

9.1. ПОЛУКОНСЕРВАТИВНАЯ РЕПЛИКАЦИЯ ДНК И ХРОМОСОМ

Структура ДНК и правило комплементарного спаривания оснований дают представление о возможных механизмах удвоения (репликации) ДНК. Теоретичеки таких механизмов три.

1. Цепи отделяются друг от друга, и каждая служит матрицей для построения комплементарной цепи. В результате синтезируются две молекулы, у каждой из которых одна цепь старая и одна новая. Такой способ репликации ДНК называют **полуконсервативным** (рис. 9.1, *а*).

2. Если после удвоения одна молекула оказывается состоящей из двух старых цепей, а другая – из двух новых, говорят о **консервативном** механизме репликации (рис. 9,1, *б*).

3. При **дисперсном** механизме репликации каждая из двух вновь образованных молекул должна содержать в обеих цепях как новые, так и старые участки (рис. 9.1, *в*). Чтобы узнать, какой из механизмов реализуется в клетках, надо уметь различать старые и новые цепи ДНК. Эту проблему смогли разрешить американские исследователи М. Мезельсон и Ф. Сталь в экспериментах по репликации ДНК кишечной палочки. Бактерии в течение большого числа поколений выращивали на среде, содержащей тяжелый изотоп азота ^{15}N. У таких бактерий весь азот в ДНК замещался этим изотопом, и, следовательно, ДНК имела бóльшую плотность, чем ДНК бактерий, выращенных на нормальной среде. Плотность молекул ДНК можно определить, центрифугируя ее в растворе хлористого цезия с очень высокой скоростью в течение нескольких дней. Под действием силы тяжести молекулы движутся и занимают в пробирке место, в котором их плотность равна плотности раствора. После переноса бактерий на среду с нормальным (легким) изотопом ^{14}N через определенные промежутки времени отбирали образцы культуры, выделяли ДНК и определяли ее плотность. В этих клетках синтезируется новая ДНК, в которую включаются легкие атомы азота. Если новая двойная спираль содержит одну родительскую и одну дочернюю цепи, то спустя одно поколение после переноса будет обнаружена ДНК с промежуточной плотностью; после двух циклов – ДНК с промежуточной плотностью и легкая ДНК. Если репликация консервативна, то старая молекула будет иметь две тяжелые цепи, а новая - две легкие, и после одного, и после двух циклов репликации в нормальной среде будет обнаруживаться как тяжелая, так и легкая ДНК. При дисперсном типе репликации должна появляться ДНК с промежуточной плот-

тенцией к формированию новых половых клеток и множества соматических клеток. Цикл полового размножения охватывает период от момента появления первичных половых клеток до их образования в следующем поколении. У большинства видов животных и растений в процессе полового размножения происходит слияние мужской и женской гамет, причем строго внутривидовое. Одним из главных механизмов, обеспечивающих этот феномен, является точное соответствие числа и архитектоники хромосом женских и мужских половых клеток, а также сродство цитоплазмы яйцеклетки и ядра сперматозоида.

Партеногенез – тип полового размножения, при котором женские половые клетки развиваются без оплодотворения. Для ряда видов партеногенез – нормальное явление (например, для низших ракообразных, коловраток, перепончатокрылых), но иногда у видов, обычное размножение которых связано с оплодотворением, отдельные яйцеклетки начинают развиваться партеногенетически. Партеногенез обеспечивает воспроизводство при редких контактах разнополых особей и возможность резкого увеличения численности. У некоторых насекомых и ракообразных известен также личиночный партеногенез (педогенез), который служит механизмом, компенсирующим недостаточную плодовитость взрослых особей.

Выделяют следующие естественные формы партеногенеза:

1) *амфитокия* (дейтеротокия) – из неоплодотворенных яиц развиваются особи обоих полов (известна у некоторых тлей);

2) *арренотокия* – неоплодотворенные яйца развиваются только в самцов, а для возникновения самок необходимо оплодотворение (встречается у видов с гаплоидно-диплоидным определением пола – перепончатокрылых насекомых и некоторых членистоногих);

3) *телитокия* – из неоплодотворенных яиц развиваются только самки (характерна для некоторых тлей, а также ящериц). Во всех случаях телетокия контролируется внутриклеточными эндосимбионтами, которые обусловливают нежизнеспособность самцов.

Как единственная форма размножения партеногенез практически не существует, так как он либо чередуется с половым размножением, либо является принадлежностью отдельных рас. Из позвоночных естественный партеногенез характерен только для пресмыкающихся и индеек. Известно, что до 40% отложенных индейками неоплодотворенных яиц могут начать развиваться, но только в редких, единичных случаях это развитие доходит до конца. Все выведенные таким способом птенцы оказываются самцами. Партеногенез у индеек, скорее всего, представляет собой отклонение от нормального размножения посредством оплодотворения. В отличие от них, у трех рас ящерицы *Lacerta saxicola*, состоящих из одних самок, партеногенез представляет собой естественный способ размножения.

В 1886 г. русский зоолог А.А. Тихомиров показал, что обрабатывая яйца морского ежа хлороформом или стрихнином, можно стимулировать начальные стадии их развития; более того, воздействуя раствором серной кислоты на яйца шелкопряда, ему впервые удалось вызвать искусственный партеногенез. В дальнейшем именно этот объект был использован выдающимся отечественным генетиком Б.Л. Астауровым для разработки эффективной технологии партеногенетического размножения шелкопряда в производственных условиях. В соответствии с данной технологией, не прошедшие мейоз и неоплодотворенные яйца подвергают короткому нагреванию до

46 °C, одновременно активируя и диплоидизируя их (нет редукционного деления и кроссинговера, и яйца содержат обе половые хромосомы гетерогаметной матери — ZW). Потомство состоит из одних самок. Этот метод амейотического партеногенеза, разработанный в 40-е гг., представляет ценность тем, что потомки в точности воспроизводят генотип матери, и можно быстро и в большом количестве размножать ценный линейный материал.

Такой амейотический партеногенез наблюдается у реснитчатых и круглых червей, коловраток, моллюсков, некоторых видов насекомых, у карпа *Carassius auratus gibelio*.

Для практического шелководства наиболее выгодным является получение только самцов, так как из их коконов выходит более длинная шелковая нить. Получение чисто мужского потомства у тутового шелкопряда достигается с помощью экспериментального андрогенеза (термин предложен М. Ферворном в 1892 г.). **Андрогенез** — развитие организма из яйца с инактивированным ядром, оплодотворенного нормальным спермием, по сути — мужской партеногенез; в природе встречается редко (у некоторых растений и перепончатокрылых насекомых), искусственный андрогенез применяется в селекционно-генетических целях. Таким образом, Б.Л. Астауров, вместе со своими сотрудниками разработал способ регуляции пола потомства, одновремённо позволяющий с большой точностью исследовать взаимоотношения ядра и цитоплазмы в генетических процессах (рис. 8.11).

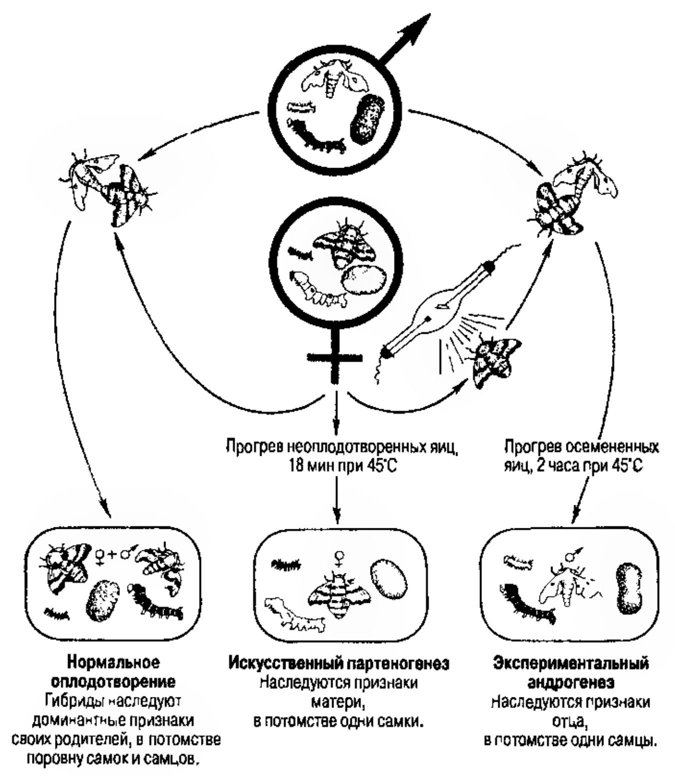


Рис. 8.11. Схема получения потомства желаемого пола у тутового шелкопряда. (Из: Гершензон, 1983)

В.А. Струнников разработал метод мейотического партеногенеза, при котором мейоз протекает нормально, а двухчасовым снижением температуры до (5–11) °С стимулируется развитие неоплодотворенных яиц и диплоидизация во время первого деления. В результате партеногенетическое потомство состоит из одних самцов.

Таким образом, кроме амейотического механизма диплоидизации при партеногенезе, существует мейотический, который, как показано в целом ряде исследований, представлен несколькими вариантами. Диплоидная яйцеклетка может образоваться:

1) *при сохранении коньюгации гомологов и кроссинговера, но при отсутствии редукционного деления.* Такой способ размножения присущ малому числу партеногенетически размножающихся видов, среди которых в основном – насекомые. В эту же группу должны быть включены спонтанные триплоиды у земноводных и человека;

2) *при отсутствии эквационного деления.* Эта группа более многочисленна и представлена как видами, способными к случайному партеногенезу или дающими редкое триплоидное потомство (включая мышей, крыс и человека), так и размножающимися партеногенетически или гиногенетически. **Гиногенез** - форма партеногенеза, при которой спермий не сливается с женским пронуклеусом, а лишь проникает в яйцеклетку и стимулирует ее дробление (известен у некоторых круглых червей, рыб, земноводных и многих покрытосеменных растений). В случае естественного гиногенеза число хромосом у развивающихся особей нормальное, диплоидное. Но искусственный гиногенез часто связан с гаплоидией, что приводит к снижению жизнеспособности зародышей;

3) *при слиянии двух гаплоидных ядер:* либо гаплоидного пронуклеуса с ядром второго направительного тельца, либо ядра первого направительного тельца с женским пронуклеусом. Существенно, что невозможно различить в эксперименте: отсутствие редукционного деления при наличии кроссинговера (1) и слияние пронуклеуса с ядром первого направительного тельца, а также отсутствие эквационного деления (2) и слияние пронуклеуса с ядром второго направительного тельца;

4) *при удвоении хромосом гаплоидного пронуклеуса.* Процесс приводит к гомозиготности потомства по всем локусам, что, по-видимому, и является причиной весьма ограниченной распространенности этого механизма у партеногенетических видов;

5) *из клеток, в которых произошло премейотическое удвоение, не сопровождающееся цитокинезом.* Такое удвоение может привести либо к образованию двуядерного ооцита (например, у лягушек), либо – к формированию тетраплоидного ядра ооцита (например, у планарий).

В настоящее время показано, что искусственный партеногенез возможен практически у всех видов животных, необходим только соответствующий подбор факторов и условий, стимулирующих диплоидность их яйцеклеток. Однако млекопитающие – единственный класс позвоночных, который вследствие геномного импринтинга (см. гл. 22) имеет функциональные различия материнского и отцовского геномов. Результатом этого феномена является ранняя гибель искусственно полученных партеногенетических эмбрионов. Так, в эксперименте было установлено, что диплоидные партеногенетические эмбрионы мышей погибают на преимплантационных стадиях развития или вскоре после имплантации. С помощью трансформирующего ростового фактора удается пролонгировать развитие партеногенетических эмбрионов и на постимплантационных стадиях.

глава

РЕПЛИКАЦИЯ ДНК И ХРОМОСОМ

9.1. ПОЛУКОНСЕРВАТИВНАЯ РЕПЛИКАЦИЯ ДНК И ХРОМОСОМ

Структура ДНК и правило комплементарного спаривания оснований дают представление о возможных механизмах удвоения (репликации) ДНК. Теоретичеки таких механизмов три.

1. Цепи отделяются друг от друга, и каждая служит матрицей для построения комплементарной цепи. В результате синтезируются две молекулы, у каждой из которых одна цепь старая и одна новая. Такой способ репликации ДНК называют **полуконсервативным** (рис. 9.1, *а*).

2. Если после удвоения одна молекула оказывается состоящей из двух старых цепей, а другая – из двух новых, говорят о **консервативном** механизме репликации (рис. 9,1, *б*).

3. При **дисперсном** механизме репликации каждая из двух вновь образованных молекул должна содержать в обеих цепях как новые, так и старые участки (рис. 9.1, *в*). Чтобы узнать, какой из механизмов реализуется в клетках, надо уметь различать старые и новые цепи ДНК. Эту проблему смогли разрешить американские исследователи М. Мезельсон и Ф. Сталь в экспериментах по репликации ДНК кишечной палочки. Бактерии в течение большого числа поколений выращивали на среде, содержащей тяжелый изотоп азота ^{15}N. У таких бактерий весь азот в ДНК замещался этим изотопом, и, следовательно, ДНК имела бо́льшую плотность, чем ДНК бактерий, выращенных на нормальной среде. Плотность молекул ДНК можно определить, центрифугируя ее в растворе хлористого цезия с очень высокой скоростью в течение нескольких дней. Под действием силы тяжести молекулы движутся и занимают в пробирке место, в котором их плотность равна плотности раствора. После переноса бактерий на среду с нормальным (легким) изотопом ^{14}N через определенные промежутки времени отбирали образцы культуры, выделяли ДНК и определяли ее плотность. В этих клетках синтезируется новая ДНК, в которую включаются легкие атомы азота. Если новая двойная спираль содержит одну родительскую и одну дочернюю цепи, то спустя одно поколение после переноса будет обнаружена ДНК с промежуточной плотностью; после двух циклов – ДНК с промежуточной плотностью и легкая ДНК. Если репликация консервативна, то старая молекула будет иметь две тяжелые цепи, а новая – две легкие, и после одного, и после двух циклов репликации в нормальной среде будет обнаруживаться как тяжелая, так и легкая ДНК. При дисперсном типе репликации должна появляться ДНК с промежуточной плот-

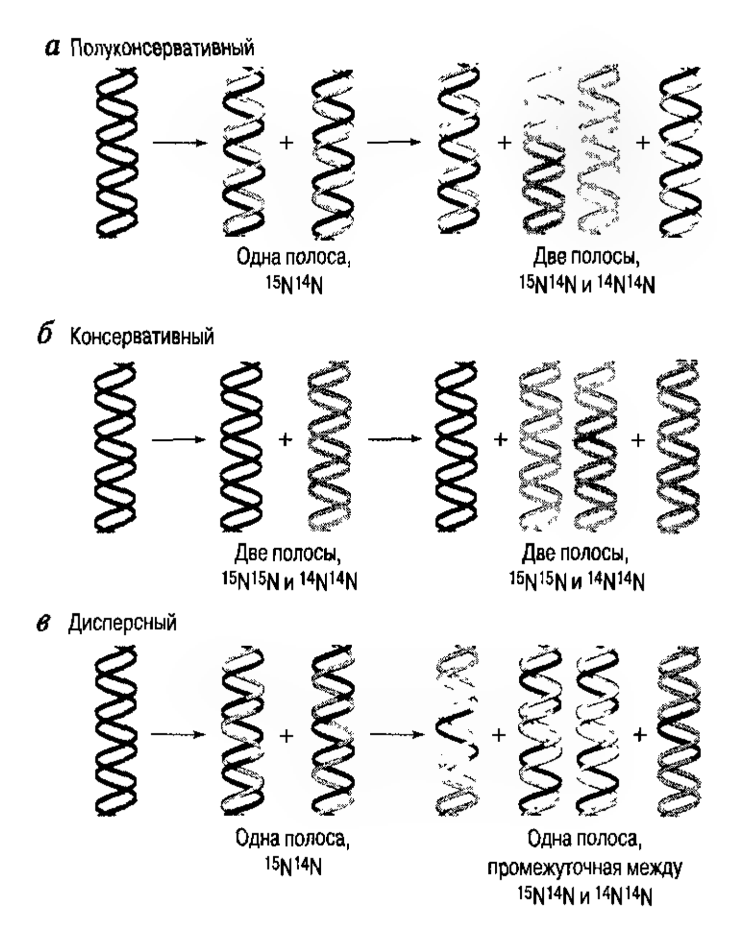


Рис. 9.1. Теоретически возможные механизмы репликации ДНК: *а* – полуконсервативный; *б* – консервативный; *в* – дисперсный. (Из: Griffiths et al., 2002)

ностью, но обе цепи молекулы должны содержать и тяжелый, и легкий изотопы. Результаты, полученные М. Мезельсоном и Ф. Сталем, представлены на рис. 9.2. После одного цикла в нормальной среде обнаружена только ДНК с промежуточной плотностью, после двух – половина ДНК имела промежуточную плотность, половина была легкой. При разделении цепей ДНК промежуточной плотности и центрифугировании одноцепочечной ДНК обнаруживаются тяжелые и легкие цепи. Эти результаты свидетельствуют о полуконсервативном типе репликации ДНК у кишечной палочки. Позднее подобные эксперименты проводили с другими прокариотическими и эукариотическими организмами, и всегда оказывалось, что репликация ДНК полуконсервативна.

Удвоение хромосом в ядрах эукариот также происходит полуконсервативным способом. Это было доказано Дж. Тейлором в опытах на митотических клетках корешка бобов *Vicia faba*. Семена проращивали на среде, содержащей меченый ^{3}H-тимидин. Радиоактивная метка включается в ДНК; ее можно обнаружить в хромосомах

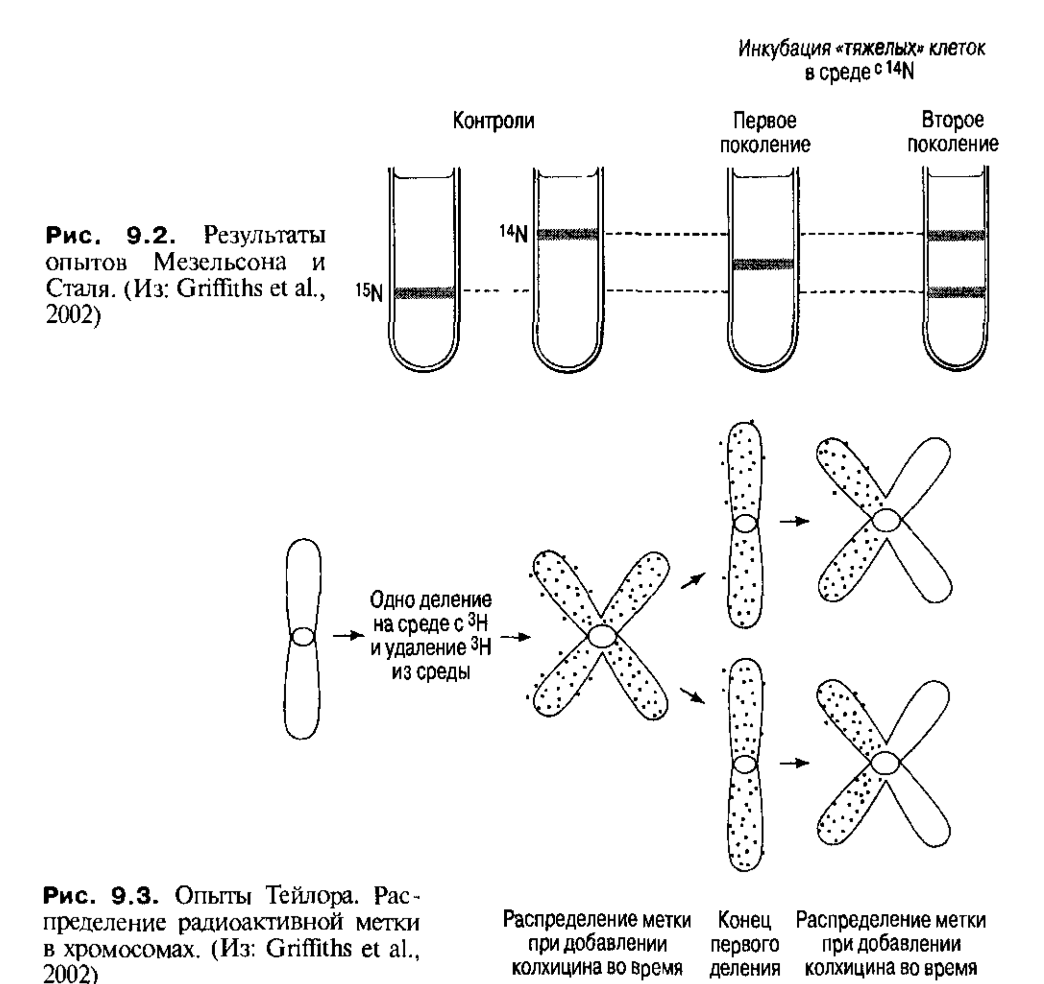


Рис. 9.2. Результаты опытов Мезельсона и Сталя. (Из: Griffiths et al., 2002)

Рис. 9.3. Опыты Тейлора. Распределение радиоактивной метки в хромосомах. (Из: Griffiths et al., 2002)

делящихся клеток. Если перенести корешки в среду без метки, во вновь синтезированные цепи ДНК будет включаться немеченый тимидин. После одного деления клеток в нормальной среде метку обнаруживали в обеих хроматидах метафазных хромосом, после второго деления – одна хроматида содержала метку, другая не содержала метки (рис. 9.3). Эти результаты согласуются с представлением о том, что хроматида состоит из одной молекулы ДНК, и ДНК реплицируется полуконсервативно (рис. 9.4). Позднее Дж. Тэйлор показал, что перед мейотическим делением происходит также полуконсервативная репликация ДНК.

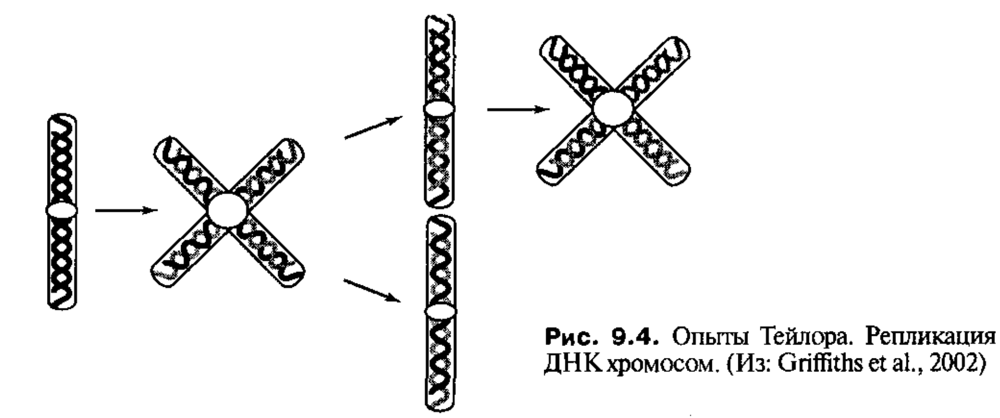


Рис. 9.4. Опыты Тейлора. Репликация ДНК хромосом. (Из: Griffiths et al., 2002)

Таким образом, репликация ДНК у про- и эукариотических организмов происходит по полуконсервативному механизму. Каждая из двух цепей молекулы служит матрицей для создания комплементарной цепи, и каждая новая молекула состоит из одной родительской и одной дочерней цепи.

9.2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕПЛИКАЦИИ ГЕНОМОВ У ПРО- И ЭУКАРИОТ

9.2.1. ТИПЫ РЕПЛИКАЦИИ ГЕНОМОВ

Репликация начинается с того, что в определенной точке происходит разъединение двойной спирали и образование одноцепочечных участков ДНК, которые служат матрицей для синтеза новой цепи. Участок, в котором в данный момент времени происходит синтез ДНК, называют **вилкой репликации**. Описано три типа репликации геномов.

1. Репликация бактериальных и вирусных кольцевых геномов начинается с определенной точки и идет в противоположных направлениях, т.е. у бактерий и вирусов существует одна точка начала репликации (*ori*) и две репликационные вилки. Реплицирующаяся хромосома напоминает по структуре греческую букву θ. По завершении репликации θ-типа образуются две кольцевые молекулы (рис. 9.5).

2. У некоторых вирусов (например, у бактериофага λ) и при амплификации ДНК генов рРНК в оогенезе у амфибий в одной цепи их кольцевой хромосомы происходит разрыв фосфодиэфирной связи. Затем к свободному 3′-концу разорванной цепи начинают присоединяться нуклеотиды, эта цепь растет, а кольцевая цепь служит матрицей. По мере роста разорванной цепи ее 5′-конец постепенно смещается, и начинается построение цепочки, комплементарной этому участку. Образующаяся струк-

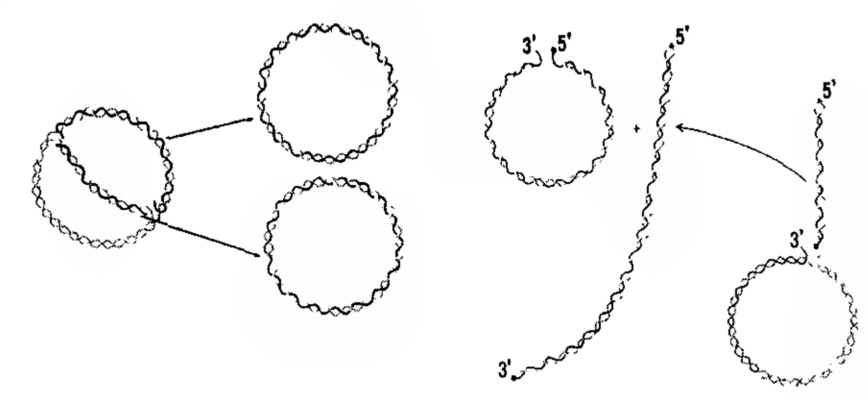


Рис. 9.5. θ-тип репликации кольцевой ДНК у бактерий. (По: Айала и Кайгер, 1988)

Рис. 9.6. σ-тип репликации кольцевой ДНК у вирусов. (По: Айала и Кайгер, 1988)

тура похожа на греческую букву σ (сигма). Такой тип репликации называют «катящимся кольцом» или σ-типом. Вновь синтезированный «хвост» в определенных точках разрезается, и по завершении одного цикла репликации образуется одна кольцевая молекула и одна линейная. Длина образующегося «хвоста» иногда может в несколько раз превышать длину окружности кольцевой молекулы (рис. 9.6).

Рис. 9.7. Полирепликонная репликация линейных молекул ДНК. (По: Айала и Кайгер, 1988)

3. Линейные хромосомы (у некоторых вирусов и эукариот) начинают реплицироваться в одной или нескольких точках, две вилки репликации движутся в противоположных направлениях. По завершении репликации образуются две линейные молекулы (рис. 9.7).

Участок генома в пределах которого репликация начинается и заканчивается, называется репликоном. Геномы прокариот удваиваются целиком, в одном цикле репликации, следовательно, их геномы представляют собой один репликон. В геномах эукариот точек начала репликации множество (несколько сотен или тысяч). Репликация ДНК начинается одновременно во многих точках, следовательно, геном представлен множеством репликонов.

Как в любом матричном процессе, в репликации можно выделить три этапа: инициацию, элонгацию и терминацию.

9.2.2. ИНИЦИАЦИЯ РЕПЛИКАЦИИ

Инициация репликации включает формирование репликационной вилки и синтез РНК-праймера. В этом процессе участвует большое число белков и ферментов-

гов. Инициирующие белки должны выполнить, по крайней мере, три основные функции: 1) облегчить раскручивание молекул ДНК и ее локальную денатурацию в области начала репликации; 2) обеспечить связь белков и ферментов, участвующих в репликации, с точками начала репликации; 3) обеспечить координацию клеточного цикла и процессов репликации. Для инициации репликации у эукариот, в отличие от прокариот, связывания инициирующих белков с точками начала репликации недостаточно. Достижение компетентности в данном случае — сложный многоэтапный процесс.

Инициация репликации происходит в строго определенных участках. Выделены и определены последовательности нуклеотидов в точках начала репликации у кишечной палочки *E. coli*, многих фагов и плазмид, у дрожжей, млекопитающих и некоторых вирусов эукариот.

У *E. coli* этот сайт (*oriC*) представляет собой участок ДНК размером 245 нуклеотидов, состоящий из серии 9- и 13- нуклеотидных повторов. Область *oriC* у бактерий очень консервативна, хотя есть виды, у которых она не обнаружена. Процесс инициации начинается с присоединения к хромосоме белка DnaA. Это приводит к разделению цепей и способствует работе основного расплетающего белка — **геликазы** (DnaB). В решении топологических проблем, связанных с разделением цепей двойной спирали, участвует и фермент **гираза**. С образовавшейся одноцепочечной ДНК связываются белки SSB (от англ. *single strand binding*), которые стабилизируют вилку репликации. Фермент **праймаза** синтезирует РНК-праймеры на лидирующей и отстающей цепях.

Размер и структура элементов, обеспечивающих начало репликации у эукариот и прокариот, различны. Общим для всех сайтов начала репликации является их обогащенность АТ-парами. По-видимому, это необходимо для обеспечения локальной денатурации, поскольку АТ-пары образуют только две водородные связи.

События, происходящие при инициации репликации у эукариот и связи ее с клеточным циклом, лучше всего изучены у дрожжей. Рассмотрим инициацию репликации и клеточный цикл у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (рис. 9.8). На стадии G1, когда активность циклин-зависимой киназы Cdk1 низка, формируется пре-репликационный комплекс, в состав которого входят шесть белков комплекса ORC (ORC1-6) и белки Cdc6 и Mcm. Высоко консервативные белки, составляющие комплекс ORC специфически связываются с точками начала репликации и служат основой для присоединения других инициирующих белков Cdc6 и Mcm. При переходе от стадии G1 к стадии S активность Cdk1 возрастает и Cdc6p покидает комплекс. На его место «встает» белок Cdc45. В этой перестройке комплекса, необходимой для активации точки начала репликации в течение стадии S, принимает участие белок Cdc7-Dbf4-киназа. После инициации репликации пре-репликационный комплекс превращается в пост-репликационный, он состоит только из белков ORC, связанных с хроматином. Этот комплекс сохраняется до конца митоза, когда активность Cdk1 падает. Образование нового пре-репликационного комплекса становится возможным только в следующей стадии G1. Таким образом, в течение одного клеточного цикла происходит лишь один цикл репликации. Белки ORC остаются связанными с точкой начала репликации, другие компоненты пре-репликационного комплекса или покидают его, или становятся частью вилки репликации. Например, белки Mcm2p-Mcm7p,

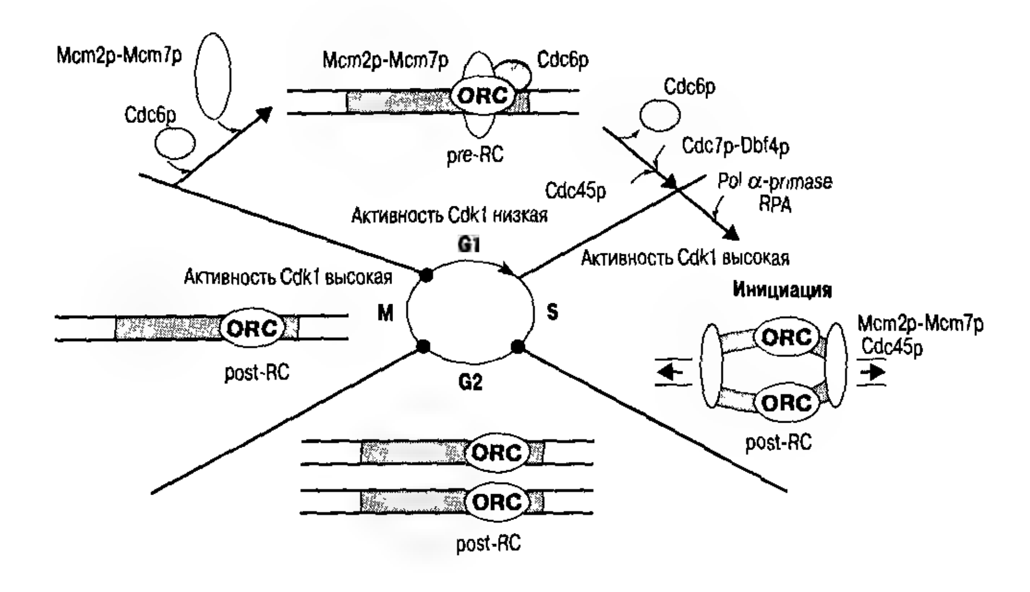


Рис. 9.8. Клеточный цикл и репликация ДНК у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae.* (Из: Bielinsky & Gerbi, 2002)

Таблица 9.1. **Гены и белки, вовлеченные в синтез ДНК у *E. coli***

Локус	Белок
polA	ДНК-полимераза I
polB	ДНК-полимераза II
dnaE	α-субъединица ДНК-полимеразы III
dnaX	Субъединица ДНК-полимеразы III
dnaZ	Субъединица ДНК-полимеразы III
dnaN	Субъединица ДНК-полимеразы III
dnaQ	Субъединица ДНК-полимеразы III
dnaT	Субъединица ДНК-полимеразы III
gyrA	Субъединица ДНК-гиразы
gyrB	Субъединица ДНК-гиразы
lig	ДНК-лигаза
dnaG	Праймазная субъединица праймосомы
dnaC	Субъединица праймосомы
dnaB	Субъединица праймосомы, геликаза
rpoB	Субъединица РНК-полимеразы
dnaI	Инициация репликации
dnaA	Инициация репликации
dnaP	Инициация репликации
oriC	Сайт инициации репликации
ssb	SSB-белок

по-видимому, функционируют как репликативная геликаза. У всех изученных эукариот схема событий и белки, участвующие в инициации, сходны. Однако есть и некоторые отличия. Так, у некоторых организмов (другой вид дрожжей, дрозофила, ксенопус) для присоединения Mcm2p-Mcm7p к хроматину необходим дополнительный белок Cdt1. У дрожжей белки ORC остаются связанными с хроматином на всех стадиях клеточного цикла, а у позвоночных во время митоза они отделяются от хроматина и вновь соединяются с ним только в стадии G1. До сих пор не ясно, как репликационная машина (α-ДНК-полимераза-праймаза и репликационный белок А) связывается с точкой начала репликации, как части инициирующего комплекса (Mcm2p-Mcm7p и Cdc45p) преобразуются в компоненты вилки репликации. Гены, кодирующие основные белки, участвующие в инициации репликации ДНК у человека, приведены в табл. 9.2.

Разделение двойной спирали происходит с помощью ДНК-геликазы и репликационного белка RPA (от англ. — *replication protein A*). Репликационный белок А, состоящий из трех полипептидов, связывается с одноцепочечный ДНК, таким образом он выполняет ту же функцию, что и SSB-белки у кишечной палочки. Затем α-ДНК-полимераза-праймаза синтезирует короткие (длиной примерно 30 п.н.) РНК-праймеры на лидирующей и отстающей цепях. После этого происходит замена α-полимеразного комплекса на комплекс δ-ДНК-полимеразы – основного фермента репликации ДНК у эукариот.

9.2.3. ЭЛОНГАЦИЯ ЦЕПЕЙ ДНК

Синтез новых цепей ДНК осуществляется группой ферментов с общим названием ДНК-полимеразы. ДНК-полимеразы многих организмов выделены и хорошо охарактеризованы. Все полимеразы способны образовывать ковалентную связь между 3′-концом цепи и 5′-концом свободного нуклеотидтрифосфата. Следовательно, новая цепь растет в направлении от 5′-конца к 3′-концу вдоль матричной цепи, имеющей противоположное направление 3′ → 5′ (рис. 9.9). Реакцию присоединения нуклеотида эти ферменты осуществляют только в присутствии одноцепочечной матрицы и короткого двухцепочечного участка со свободным 3′-концом — **праймера**. Первый дезоксирибонуклеотид присоединяется к 3′-концу РНК-праймера. Затем ДНК-полимераза один за другим присоединяет нуклеотиды, строя, таким образом, цепочку ДНК. Поскольку все полимеразы способны строить цепь только в одном направлении, на 3′–5′ родительской цепи синтез новой цепи будет идти непрерывно, эту цепь принято называть **лидирующей**. Лидирующая цепь растет в направлении движения вилки, для ее элонгации необходим лишь один акт инициации. На другой цепи синтез осуществляется короткими фрагментами, которые называют **фрагментами Оказаки** по имени исследователя, впервые их обнаружившего (рис. 9.9). Эта цепь называется **запаздывающей**, или **отстающей**. Длина фрагментов Оказаки составляет 1 000–2 000 п.н. у прокариот и 100–200 п.н. у эукариот. Отстающая цепь растет в направлении противоположном движению вилки, при ее синтезе необходимо множество актов инициации.

Фрагменты Оказаки объединяются в непрерывную цепь ДНК после удаления РНК-праймеров и застраивания освободившихся участков дезоксирибонуклеотида-

ми. Реакцию сшивания фрагментов осуществляют ферменты *ДНК-лигазы*, которые катализируют образование ковалентной связи между 3′-ОН одного фрагмента и 5′-фосфатом следующего.

Общая схема процессов, происходящих при элонгации цепей, одинакова у про- и эукариот.

У кишечной палочки в репликации ДНК участвуют два фермента: ДНК-полимераза I и ДНК-полимераза III. Ключевым ферментом репликации является ДНК-полимераза III. Полный комплекс ДНК-полимеразы III, способный осуществлять реакцию полимеризации, включает, по крайней мере, 20 разных белков, но каталитическую функцию выполняют 3 субъединицы – α (альфа), обладающая полимеразной активностью, ε (эпсилон), обладающая 3′ → 5′экзонуклеазной активностью, и θ (тета), функция которой пока неясна. Функции других субъединиц тоже неизвестны. Одна из них – β – уменьшает вероятность отделения фермента от матрицы до завершения процесса копирования. В каждой вилке репликации находится две молекулы холофермента, а в клетке – 10–20 молекул. Он синтезирует ДНК лидирующей и отстающей цепей.

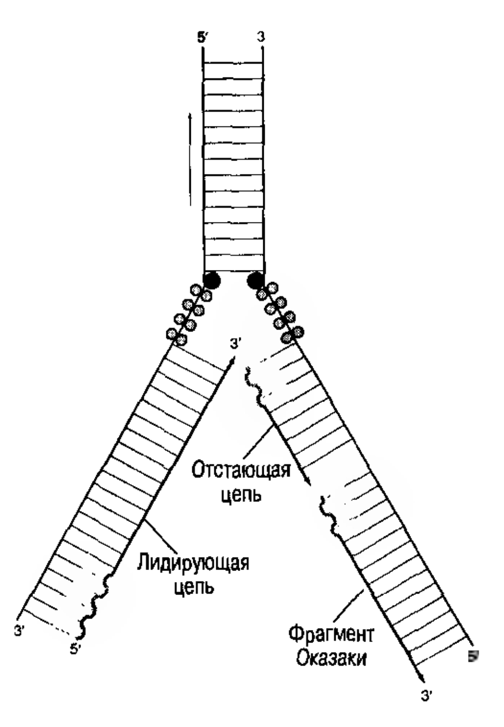


Рис. 9.9. Схема вилки репликации. (Из: Griffiths et al., 2002)

ДНК-полимераза I участвует в синтезе отстающей цепи. Этот фермент состоит из одной полипептидной цепи и имеет 3 ферментативные активности. Благодаря 5′ → 3′-экзонуклеазной активности он удаляет РНК-праймер, отщепляя рибонуклеотиды с 5′-концов фрагментов Оказаки. Его полимеразная активность обеспечивает наращивание цепи ДНК предыдущего фрагмента. 3′ → 5′-экзонуклеазная активность позволяет контролировать правильность присоединения каждого нуклеотида и удалять ошибочно вставленные неспаренные нуклеотиды с растущего конца цепи.

В репликативном синтезе ядерной ДНК эукариот участвуют два фермента: δ- и ε-ДНК-полимеразы. Наращивание лидирующей и отстающей цепей обеспечивает сложный белковый комплекс, в составе которого самое важное значение имеет δ-ДНК-полимераза, репликационный фактор RFC (от англ. *replication factor C*) и белок PCNA (от англ. *proliferating cell nuclear antigen*). Репликационный фактор RFC состоит из пяти субъединиц различной молекулярной массы (140/145, 40, 38, 37 и 36.5 кДа). Этот белок связывается с 3′-концом только что синтезированного праймера и блокирует его наращивание, выполняемое α-ДНК-полимеразой) при длине примерно 30 нуклеотидов. На этой стадии RFC способствует связыванию ДНК с белком PCNA, который, по-видимому, играет роль связующего звена между полимеразами и

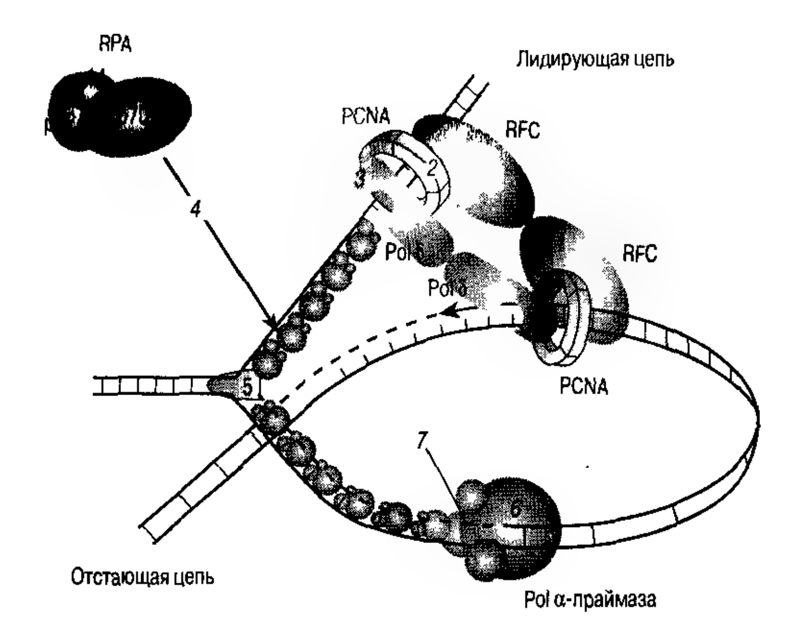


Рис. 9.10. Вилка репликации у эукариот. (Из: Лаврик с соавт., 2003)

другими белковыми факторами комплекса. В результате этих процессов α-ДНК-полимераза вытесняется с 3′-конца растущей цепи. Дальнейший синтез продолжается другими ферментами – δ- и ε-полимеразами. δ-ДНК-полимераза человека – мультимерный белок, состоящий из четырех субъединиц 125, 50, 68 и 12 кДа. Тройной комплекс RFC–PCNA–δ-ДНК-полимераза обеспечивает элонгацию обеих цепей ДНК (рис. 9.10). Кроме репликации δ-ДНК полимераза участвует и в репаративных синтезах ДНК.

Удаление праймеров и сшивание фрагментов Оказаки происходит с участием δ-ДНК-полимеразы, РНКазы Н, ДНК-лигазы и флэп-эндонуклеазы. РНКаза Н катализирует расщепление РНК в гибридных РНК-ДНК-молекулах, флэп-эндонуклеаза отщепляет так называемые «свисающие 5′- концы», которые образуются в результате того, что δ-ДНК-полимераза обеспечивает синтез с вытеснением цепи.

Синтез митохондриальной ДНК осуществляет γ-ДНК-полимераза. Но механизм репликации ДНК в митохондриях несколько отличается от репликации хромосомной ДНК прокариот и эукариот. Наиболее важная особенность репликации митохондриальной ДНК – наличие сайтов инициации, специфичных для каждой из комплементарных цепей ДНК. Ген *POLG*, кодирующий γ-ДНК-полимеразу у человека, локализован в 15q25. Праймер синтезируется митохондриальной ДНК-зависимой РНК-полимеразой, отвечающей как за экспрессию митохондриальных генов, так и за создание РНК-праймера для инициации репликации митохондриального генома. У человека этот белок кодирует ген *POLRMT*, локализованный в 19p13.3. Продукт этого гена больше похож на РНК-полимеразы фагов и митохондриальные полимеразы низших эукариот.

Другие многочисленные ДНК-полимеразы эукариот обеспечивают синтез ДНК, необходимый для репарации повреждений ДНК и рекомбинации.

9.2.4. ТЕРМИНАЦИЯ РЕПЛИКАЦИИ

У кишечной палочки существует участок, который обеспечивает терминацию репликации ДНК. В этом участке содержится несколько коротких последовательностей, так называемых *ter*-сайтов (длиной ≈23 п.н.). Прекращение движения репликационной вилки обеспечивается связыванием продукта гена *tus* с сайтами терминации.

Точки терминации – не обязательный элемент репликона. При двунаправленной репликации синтез ДНК прекращается, когда встречаются репликационные вилки. У эукариот синтез прекращается, когда встречаются вилки соседних репликонов.

9.2.5. СКОРОСТЬ РЕПЛИКАЦИИ

Скорость роста новой цепи практически постоянна. У *E. coli* скорость копирования составляет примерно 1 500 нуклеотидов в секунду. Скорость движения репликационной вилки в эукариотических клетках много ниже – 10–100 п.н. в секунду.

Скорость репликации генома определяется в основном частотой инициации репликации. Высокая скорость репликации генома у эукариот обеспечивается одновременной инициацией множества точек начала репликации. Например, в клетках ранних эмбрионов дрозофилы репликация всего генома происходит каждые 3 мин, точки начала репликации отстоят друг от друга на 7 000–8 000 п.н. В культуре клеток дрозофилы скорость репликации генома значительно ниже, инициируется меньше точек начала репликации, они располагаются на расстоянии 40 000 п.н. друг от друга.

9.2.6. ТОЧНОСТЬ РЕПЛИКАЦИИ

Точность копирования ДНК чрезвычайно высока. Ошибочное включение основания происходит с частотой 10^{-8}–10^{-10}. Однако известно, что физико-химические свойства оснований при образовании водородных связей должны давать более высокую частоту ошибок – до 10^{-2}. Высокая точность копирования достигается благодаря контрольным и корректорским функциям ДНК-полимераз, участвующих в репликативном синтезе ДНК.

9.2.7. РЕПЛИКАЦИЯ ТЕЛОМЕР

При репликации линейных молекул ДНК возникает проблема репликации концов. Поскольку все ДНК-полимеразы осуществляют синтез только с использованием РНК-праймеров, и праймеры впоследствии удаляются, то 5′-конец цепи должен укорачиваться на длину праймера, т.е. на 10-30 нуклеотидов. Последова-

тельное исчезновение концевых участков неизбежно должно приводить к потере генов. Теломеры — концевые участки хромосом, которые не несут генетической информации, а служат для защиты материала хромосомы от потерь при репликации и от атак эндонуклеаз. Е. Блакберн и Дж. Голл выделили теломерную ДНК и расшифровали ее структуру. Теломеры у всех изученных организмов имеют сходное строение: они состоят из многократно повторяющихся фрагментов, например у человека это — TTAGGG. Во время деления нормальной соматической клетки теломеры теряют от 5 до двадцати фрагментов и с каждым делением становятся короче. Укорочение до определенной критической длины становится сигналом к прекращению делений. Показано, что у соматических клеток есть лимит на число клеточных делений. При культивировании клеток, взятых у новорожденных детей, они могут пройти 80–90 делений, клетки 70-летних делятся только 20–30 раз. Ограничение на число клеточных делений называют **порогом Хейфлика**. Обычно клетки не преодолевают барьер из 20-90 делений. В раковых клетках и в клетках зародышевого пути, где число делений не ограничено, обнаружен фермент теломераза, который перед каждым циклом репликации добавляет TTAGGG-повторы к теломерам и таким образом компенсирует укорочение, вызванное работой ДНК-полимеразы. Теломераза присоединяет повтор последовательно нуклеотид за нуклеотидом к 3′-концу, при этом родительская ДНК не используется в качестве матрицы. Теломераза — это рибонуклеопротеиновый комплекс, РНК которого содержит последовательность нуклеотидов, выступающую в роли матрицы для синтеза TTAGGG-повтора.

9.3. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ РЕПЛИКАЦИИ. МУТАЦИИ, НАРУШАЮЩИЕ РАЗЛИЧНЫЕ ЭТАПЫ РЕПЛИКАЦИИ

Генетический контроль репликации хорошо изучен у кишечной палочки. У этого организма было получено большое число *температуро-чувствительных* (*ts*) мутантов с нарушением синтеза ДНК. Все мутанты делятся на два основных класса. К первому классу относят те из них, у которых при рестриктивной температуре немедленно прекращается синтез ДНК. У таких мутантов нарушен тот или иной процесс, протекающий в репликационной вилке. У мутантов второго класса после переноса в рестриктивную температуру синтез ДНК продолжается в течение довольно длительного времени. У этих мутантов нарушена способность инициировать новый цикл репликации. Комплементационный анализ мутаций позволил выявить большое число различных генов, участвующих в контроле репликации. Сейчас у кишечной палочки описано и локализовано более 200 таких генов.

У человека известно более 400 генов, ответственных за репликацию хромосом и контроль клеточного цикла. Локализация и функция некоторых из них представлены в *табл. 9.2–9.3*.

Таблица 9.2. **Гены человека, вовлеченные в инициацию репликации ДНК**

Символ гена	Локализация	Функция продукта
Cdc-45L	22q11.211	Высоко консервативный компонент белкового комплекса, работающего на ранних этапах репликации ДНК. У *Xenopus* этот белок играет важную роль в процессе связывания α-ДНК-полимеразы с хроматином
CDC6	17q21.3	Инициация репликации, регуляция ранних этапов репликации. Во время стадии G1 находится в ядре, но в начале S перемещается в цитоплазму. Внутриклеточные перемещения регулируются фосфорилированием циклин-зависимыми киназами Cdks
CDC7	1p22	Участвует в инициации репликации и регуляции клеточного цикла во время перехода от стадии G1 к стадии S. Протеинкиназная активность продукта этого гена возрастает во время стадии S. Избыточная экспрессия гена, возможно, связана с неопластической трансформацией некоторых опухолей
DRF1	17q21.31	Продукт является регулятором белка CDC7, который связывает регуляцию клеточного цикла и репликацию ДНК. Локализуется в ядре, экспрессия регулируется клеточным циклом
CDK7	5q12.1	Циклин-зависимая киназа, сходная с продуктом гена *cdc28 Saccharomyces cerevisiae*. Важный компонент транскрипционного фактора TFIIH, который вовлечен в инициацию транскрипции и репарацию ДНК. Возможно, этот белок осуществляет прямую связь между регуляцией транскрипции и клеточного цикла
MCM2	3q21	Субъединица гексамерного белкового комплекса МСМ, ключевого компонента пре-репликационного комплекса. Возможно, участвует в формировании вилки репликации и в привлечении других репликационных белков. В комплексе с белками МСМ4, 6 и 7 регулирует геликазную активность комплекса
MCM3	6p12	Субъединица гексамерного белкового комплекса МСМ, ключевого компонента пре-репликационного комплекса. Возможно, участвует в формировании вилки репликации и в привлечении других белков, участвующих в репликации. Ацетилирование этого белка подавляет инициацию репликации и продвижение клеточного цикла
MCM4	8q12-q13	Инициация репликации ДНК. Субъединица гексамерного белкового комплекса МСМ
MCM5	22q13.1	Инициация репликации ДНК. Субъединица гексамерного белкового комплекса МСМ. Возможно, принимает участие в регуляции клеточного цикла
MCM6	2q21	Инициация репликации ДНК. Субъединица гексамерного белкового комплекса МСМ
MCM7	7q21.3-q22.1	Инициация репликации ДНК. Субъединица гексамерного белкового комплекса МСМ
ORC1L	1p32	Субъединица ORC-комплекса, распознающего точку начала репликации
ORC2L	2q33	Субъединица ORC-комплекса, распознающего точку начала репликации

Таблица 9.2 (окончание)

Символ гена	Локализация	Функция продукта
ORC3L	6q14.3-q16.1	Субъединица ORC-комплекса, распознающего точку начала репликации. Изучение похожего гена у дрозофилы заставляет предположить, что он играет определенную роль в пролиферации нервных клеток и ольфакторной памяти
ORC4L	2q22-23	Субъединица ORC-комплекса, распознающего точку начала репликации
ORC5L	7q22.1	Субъединица ORC-комплекса, распознающего точку начала репликации
ORC6L	16q12	Субъединица ORC-комплекса, распознающего точку начала репликации. Этот белок (и ORC1L) слабо связан с центральным комплексом, состоящим из ORC2L, -3L, -4L и -5L. Играет существенную роль в координировании репликации
RPA1	17p13.3	70 кДа-субъединица репликативного белка A, основные ДНК-связывающие домены
RPA2	1p35	14 кДа-субъединица репликативного белка A
RPA3	7p22	32 кДа-субъединица репликативного белка A
PRIM1	12q13	Субъединица 1 ДНК-праймазы, 49 кДа
PRIM2A	6p12/p11.1	Субъединица 2A ДНК-праймазы, 58 кДа
PRIM2B	6p12-p11.1	Субъединица 2B ДНК-праймазы, 58 кДа, важна для инициации, элонгации праймера
POLA	Xp22.1-p21.3	α-ДНК-полимераза, 70 кДа
POLA2	11q13.1	α-ДНК-полимераза, 70 кДа-субъединица B

Таблица 9.3. **Гены человека, вовлеченные в элонгацию цепей ДНК**

Символ гена	Локализация	Функция продукта
RFC1	4p14-p13	Самая крупная 145 кДа-субъединица репликативного фактора C, связывающегося с 3′-концом праймера и продвигающего координированный синтез обеих цепей
RFC2	7q11.23	Субъединица 40 кДа репликативного фактора C
RFC3	13q12.3-q13	Субъединица 38 кДа репликативного фактора C
RFC4	3q27	Субъединица 37 кДа репликативного фактора C
RFC5	12q24.2-q24.3	Субъединица 36,5 кДа репликативного фактора C
PCNA	20pter-p12	Кофактор δ-ДНК-полимеразы. Белок образует гомотример, который увеличивает процессивность синтеза лидирующей цепи. В хромосомах 4 и X обнаружены псевдогены
POLD1	19q13.3	Каталитическая субъединица 1 (125 кДа) δ-ДНК-полимеразы
POLD2	7p13	Регуляторная субъединица 2 (50 кДа) δ-ДНК-полимеразы
POLD3	11q14	Субъединица 3 (68 кДа) δ-ДНК-полимеразы
POLD4	11q13	Субъединица 4 (12 кДа) δ-ДНК-полимеразы
POLE	12q24.3	Субъединица ε-ДНК-полимеразы
POLE2	14q21-q22	Субъединица 2 (49 кДа) ε-ДНК-полимеразы
POLE3	9q33	Субъединица 3 ε-ДНК-полимеразы 17 кДа

Таблица 9.3 **(окончание)**

Символ гена	Локализация	Функция продукта
POLE4	2p12	Субъединица 4 ε-ДНК-полимеразы 12 кДа
FEN1	11q12	Участвует в процессинге 5′-концов фрагментов Оказаки, удаляя «свисающие концы»
LIG1	19q13.2-q13.3	ДНК-лигаза 1 функционирует во время репликации и эксцизионной репарации

9.4. ПОЛИРЕПЛИКОННОСТЬ И ДВУНАПРАВЛЕННОСТЬ РЕПЛИКАЦИИ. АСИНХРОННОСТЬ

Высокая скорость репликации гигантских геномов эукариот обеспечивается за счет одновременной инициации большого числа репликонов. При сопоставлении скорости деления клеток дрозофилы в течение первых часов эмбрионального развития и скорости синтеза ДНК, было установлено, что в ядре должно инициироваться более 20 000 репликонов. В других тканях и при других условиях число репликонов может быть иным в зависимости от продолжительности S-фазы клеточного цикла. Размеры репликонов у эукариотических организмов намного меньше, чем у бактерий и различны у разных организмов. В табл. 9.4 приведены данные о числе и средних размерах репликонов у разных видов. В каждой точке начала репликации формируются две репликационные вилки, которые движутся в противоположных направлениях. Продвижение вилки прекращается, когда она столкнется с репликационной вилкой соседнего репликона.

В разных условиях может инициироваться разное число точек начала репликации. Данные о числе точек начала репликации в клетках эмбриона дрозофилы и в культуре клеток приведены в разд. 9.2.5. Репликоны инициируются группами по 10—100 репликонов; так происходит до тех пор, пока не будет реплицирована вся ДНК.

В культуре клеток млекопитающих продолжительность S-фазы клеточного цикла составляет 6–8 ч, а время завершения синтеза ДНК в одном репликоне равно 45—60 мин. Это означает, что не все репликоны инициируются одновременно, существует определенная очередность инициации. Известно, что в различные периоды S-фазы активны разные группы репликонов. В ранней S-фазе преимущественно активируются репликоны, ассоциированные с R-дисками метафазных хромосом. Затем синтез происходит в хроматине G-дисков и центромер, и в поздней S-фазе удваивается ДНК гетерохроматина.

Таблица 9.4. **Число и размеры репликонов у разных видов (из: И.Ф. Жимулев, 2002)**

Вид	Число репликонов	Средняя длина репликона, (т.п.н.)
Escherichia coli	1	4200
Saccharomyces cerevisiae	500	40
Drosophila melanogaster	3500	40
Xenopus laevis	15000	200
Mus musculus	25000	150
Vicia faba	35000	300

9.5. РЕПЛИКАЦИЯ ХРОМОСОМ БЕЗ ДЕЛЕНИЯ ЯДРА

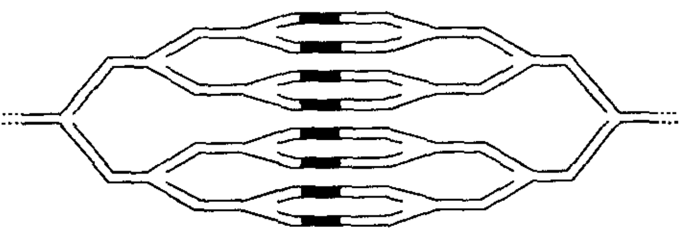
Если репликация ДНК в S-фазе, не сопровождается делением ядра, клетки становятся полиплоидными. Яркий пример последствия многократной репликации в неделящихся клетках это – гигантские **политенные** хромосомы, выявляемые у дрозофилы и других представителей отряда двукрылых. Так, в клетках слюнных желез плодовой мухи степень плоидности составляет 1024–2048. Это означает, что в них проходит 10–11 циклов репликации хромосом без деления ядра. Сестринские хроматиды не отделяются друг от друга, но остаются прилегающими по всей длине. В результате образуются гигантские, или политенные хромосомы. Для этих клеток характерно еще одно явление, связанное с репликацией – неполная политенизация, или недорепликация гетерохроматина. Эухроматиновые районы проходят все циклы репликации, гетерохроматиновые реплицируются частично. Одни районы гетерохроматина практически не политенизируются, их размер равен размерам соответствующих участков митотических хромосом. Другие участки гетерохроматина политенизируются в значительно меньшей степени, чем эухроматические. В результате неполной репликации гетерохроматина соотношение размеров гетерохроматиновых и эухроматиновых районов в митотических и политенных хромосомах одного и того же вида различно. Так, у дрозофилы в политенной Х-хромосоме клеток слюнных желез гетерохроматин составляет всего несколько процентов длины, а в митотической – более 40%.

9.6 АМПЛИФИКАЦИЯ ГЕНОВ

В некоторых случаях происходит многократная репликация отдельных групп генов – **амплификация**. Амплификация служит одним из механизмов регуляции генной активности. В результате амплификации в специфических клетках на определенных этапах развития образуется огромное число копий генов, которые затем транскрибируются. Таким образом, за сравнительно короткое время создается большое количество важного генного продукта.

9.6.1 АМПЛИФИКАЦИЯ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ ХОРИОНА У ДРОЗОФИЛЫ

В геноме дрозофилы гены, кодирующие белки хориона, сгруппированы в два кластера. Один кластер включает шесть тандемно расположенных генов и локализован в Х-хромосоме. Другой кластер, из четырех генов, находится в хромосоме 3. Примерно за 18 ч до начала синтеза хорионических белков начинается амплификация. Затем в течение 5 ч происходит активная транскрипция образовавшихся копий генов. Число копий генов белков хориона, локализованных в Х-хромосоме, увеличивается примерно в 16 раз, а генов хромосомы 3 – в 60 раз. Соседние области амплифицированы в меньшей степени, причем, чем дальше расположены участки от генов хориона, тем меньше число копий. Амплификация хорионических генов продолжается даже после прекращения нормального синтеза ДНК в фолликулярных клетках вследствие ослабления нормального контроля репликации, запрещающего многократную инициацию репликации в одной точке. Вблизи кластера генов расположено два типа коротких элементов, взаимодействие которых необходимо и достаточно для инициации амплификации. В точке начала репликации начинается двунаправленный синтез ДНК. Затем через некоторое время в этой точке начинается второй цикл репликации, затем – третий и т.д. (рис. 9.11). В результате образуется множество копий данной области, и поскольку каждая последующая вилка короче предыдущей, создается градиент числа копий. Все вновь образовавшиеся копии остаются компонентами хромосом.



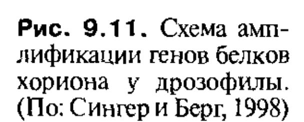


Рис. 9.11. Схема амплификации генов белков хориона у дрозофилы. (По: Сингер и Берг, 1998)

9.6.2. АМПЛИФИКАЦИЯ ГЕНОВ РИБОСОМНОЙ РНК XENOPUS

Для увеличения числа копий генов рРНК в ооцитах *Xenopus* используется совершенно иной механизм амплификации. В гаплоидном геноме этой лягушки содержится 600 копий генов рРНК. В результате избирательной репликации этих генов число копий увеличивается в тысячи раз. В первичных половых клетках образуется небольшое число экстрахромосомных кольцевых молекул, содержащих до 20 тандемно расположенных кластеров рРНК-генов. Во время мейоза происходит многократная репликация этих молекул по типу катящегося кольца. После оплодотворения яйцеклетки амплификация прекращается.

глава 10

РЕПАРАЦИЯ ДНК

Структура материального носителя наследственной информации – ДНК может нарушаться в результате действия как экзогенных (химических, физических и других агентов среды), так и эндогенных факторов (ошибки матричных процессов, действие ряда метаболитов и т.д.). В устранении этих повреждений важную роль играет диплоидность генома. Ошибки на уровне ДНК в одной хромосоме часто не имеют фенотипического проявления из-за того, что в гомологичной хромосоме аналогичный участок ДНК их не содержит. Тем не менее, клетки всех живых организмов наделены еще и специальной системой защиты, направленной на восстановление повреждений, возникших в ДНК в результате воздействия мутагенных факторов разной природы.

Идея о физиологичности мутационного процесса впервые была высказана еще в 1947 г. М.Е. Лобашевым. Впоследствии несколько исследователей независимо друг от друга предположили участие ферментных систем в восстановлении потенциальных повреждений. Так, изучая механизмы восстановления хромосомных разрывов, вызванных радиацией, Н.В. Лучник (1951 г.), С. Вольф и К. Атвуд (1954 г.) впервые указали на существование в клетке специальной системы восстановления потенциальных повреждений. В 1958 г. В.И. Корогодин в экспериментах на диплоидных дрожжах открыл феномен восстановления клеточной жизнеспособности после воздействия рентгеновских и гамма-лучей и совместно с Н.В. Лучником предложил гипотезу, согласно которой непосредственным следствием облучения являются только потенциальные повреждения хромосом, т.е. *предмутации*.

Процесс восстановления исходной нативной структуры ДНК называют **репарацией ДНК**, или генетической репарацией, а системы, участвующие в нем – *репарационными*. Репарация ДНК – один из важнейших генетических процессов в клетке, обеспечивающих ее жизнеспособность и сохранение вида в целом. В настоящее время известно несколько механизмов генетической репарации. Одни из них более просты и «включаются» сразу же после повреждения ДНК, другие требуют индукции большого числа ферментов, и их действие растянуто во времени. Существуют системы, работающие как до, так и после фазы клеточного деления.

10.1. НАРУШЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ДНК

Главный «поставщик» ошибок в нуклеотидной последовательности – репликация ДНК. Длина ее молекулы у человека составляет более 3 млрд. нуклеотидов. Нарушения в первичной структуре ДНК могут быть обусловлены:

- ошибками спаривания (основание в матричной цепи ДНК в течение короткого времени может находиться в другой таутомерной форме, позволяющей присоединить в комплементарной цепи неверное основание: наиболее частая ошибка такого типа встраивание аденина вместо цитозина с образованием пары AG;
- спонтанным отщеплением основания от цепи ДНК (например, депуринизация – отщепление пуринов);
- дезаминированием цитозина (и, как результат – превращением его в урацил);
- присоединением метильных или этильных групп к основаниям (это приводит к изменению свойств основания и, как результат, к образованию неверной пары).

Наиболее распространенный тип спонтанных повреждений ДНК – алкилирование аминогруппы гуанина (см. гл. 13). Образовавшийся при этом метилгуанин может связываться с тимином вместо цитозина, что приводит в следующем цикле репликации к транзиции - замене GC на AT. Другой часто встречающийся вариант повреждения – дезаминирование 5-метилцитозина – также ведет к транзиции - замене GC на AT. Кроме метильных или этильных групп, к основаниям способны присоединяться и более крупные химические группы, так называемые моноаддукты. Они могут препятствовать нормальному протеканию таких генетических процессов, как репликация и транскрипция.

Повреждения ДНК могут индуцироваться внешними воздействиями: ультрафиолетом, рентгеновскими лучами, химическими соединениями и т.д. Например, УФ-облучение вызывает сшивку соседних тиминовых оснований в цепи ДНК. Образующиеся при этом тиминовые димеры препятствуют нормальной репликации. Митомицин С, некоторые иприты и псоралены приводят к сшивке двух цепей ДНК.

Воздействие рентгеновского излучения, может вызывать одноцепочечные разрывы. Более жесткое излучение, такое как, α-частицы, приводит к образованию двухцепочечных разрывов ДНК.

Многие из этих повреждений как у эу-, так и у прокариот исправляются особыми механизмами клетки – системами **генетической репарации**, имеющими для жизни организма и вида в целом чрезвычайно важное значение. В результате жесткого контроля и давления отбора они не менее сложны и совершенны, чем системы репликации и транскрипции. С позиций молекулярного механизма, первичные повреждения в молекулах ДНК могут быть устранены тремя путями: прямым возвращением к исходному состоянию; вырезанием поврежденного участка и заменой его нормальным; рекомбинационным восстановлением в обход поврежденного участка.

По отношению к процессу репликации различают два основные типа репарации ДНК: *дорепликативную* (включающую фотореактивационную и эксцизионную формы, направленные на вырезание поврежденных участков ДНК) и *пострепликативную* (осуществляемую с помощью механизмов, участвующих в процессах рекомбинации и репликации ДНК).

Репарация может осуществляться как конститутивно с помощью специфического набора ферментов, постоянно присутствующих в нормально функционирующих клетках (фотореактивационная, эксцизионная и пострепликативная), так и в ответ на повреждение ДНК или прекращение ее синтеза (путем активации группы генов, контролирующих различные клеточные функции, так называемая SOS-репарация).

10.2. ПРЯМАЯ РЕПАРАЦИЯ ДНК

Этот тип репарации обеспечивает прямое восстановление исходной структуры ДНК или удаление повреждения. Широко распространенная система репарации такого рода *фотореактивация пиримидиновых димеров*. Кроме нее, к этому типу относятся: репарация ДНК за счет 3′-5′-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы, репарация одноцепочечных разрывов ДНК с помощью полинуклеотидлигазы, а также генетическая репарация повреждений, вызванных алкильными или метильными группами, путем удаления этих групп специфическими ферментами.

10.2.1. ФОТОРЕАКТИВАЦИЯ

В 1949 г. А. Кельнер и в 1950 г. Р. Дульбекко установили, что жизнеспособность актиномицетов и бактерий, подвергнутых УФ-облучению в летальных дозах, восстанавливается, если затем воздействовать на них видимым светом. Явление было названо фотореактивацией. Эффективность ее зависит от уровня pH, температуры и физиологического состояния клетки. Восстановительный эффект при фотореактивации (рис. 10.1, *а*) связан с действием фермента – дезоксирибозидпиримидинфотолиазы, представляющего собой полипептид, ассоциированный для его активности с небольшой молекулой РНК (10-15 нуклеотидов). Этот фермент расщепляет димеры двух соседних пиримидинов циклобутанового типа в одной цепи ДНК, образующиеся под влиянием УФ-лучей, действие которых подробнее рассмотрено в гл. 14. Каждый из димеров задерживает репликацию примерно на 10 секунд. Фермент присоединяется к ним и в темноте, и на свету, но реакция расщепления связей, объединяющих две молекулы пиримидинов, энергетически зависит от действия видимого света с большей длиной волны. На свету пиримидиновые димеры расщепляются, за счет разрыва ковалентных связей происходит мономеризация и таким образом восстанавливается нативная структура ДНК. К эффективному диапазону (365–490 нм) относятся наиболее длинноволновые УФ-лучи (365–390 нм) и примыкающие к ним видимые синие лучи (435–495 нм). Наибольшая эффективность фотореактивации отмечена для голубой части видимого спектра. Если же необходимо исключить возможность реактивации, то опыты следует проводить в более длинноволновой части спектра, начиная с желтого света (570–590 нм).

За 1 минуту молекула фотолиазы может расщепить 2,4 димера. У *E. coli* система фотореактивации удаляет до 90% пиримидиновых димеров и контролируется одним геном – *phr*. Штаммы, несущие мутацию по этому гену не способны к репарации ДНК.

Фотореактивации подвергаются только циклобутановые димеры. Надо отметить, что это пока почти единственная, известная ферментная реакция, в которой фактором активации служит не химическая энергия, а энергия видимого света. Дезоксирибозидпиримидинфотолиаза широко распространена у разных органических форм и представлена даже у таких примитивных микроорганизмов, как микоплазмы. Она есть у всех изученных бактерий, кроме *Micrococcus radiodurans*, которые чрезвычайно

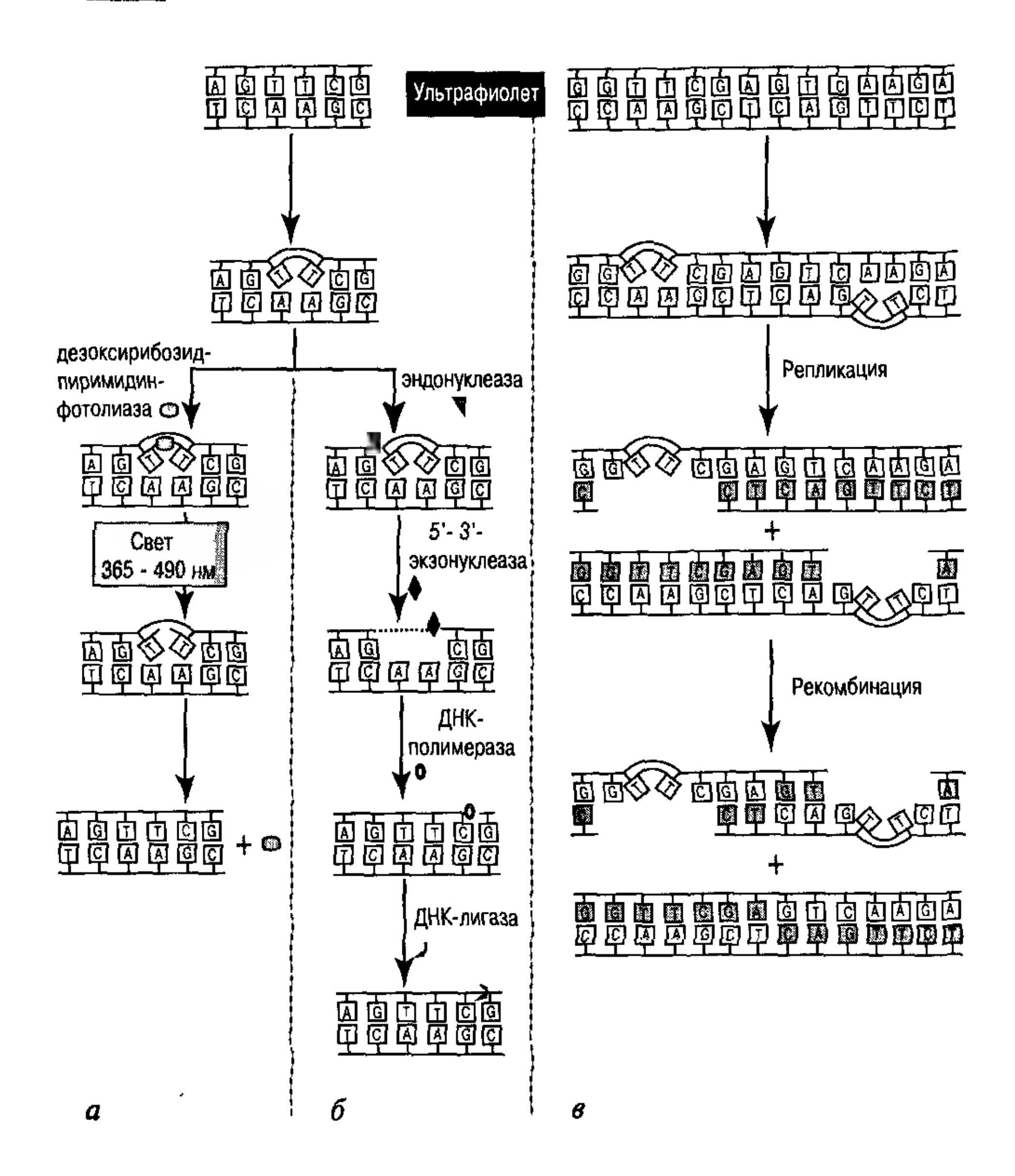


Рис. 10.1. Механизмы репарации ДНК-повреждений. (По: Rothwell, 1988)
а - фотореактивация, б - эксцизионная репарация, в постреппликативная репарация

устойчивы к действию УФ-лучей и выдерживают дозы в 1 000 раз более высокие, чем те, что летальны для *E.coli*. Фотолиаза обнаружена в клетках многих растений и животных, в том числе и у человека. По-видимому, наибольшее значение фотореактивация имеет у растений.

10.2.2. РЕПАРАЦИЯ ДНК ЗА СЧЕТ ЭКЗОНУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ

Установлено, что большинство бактериальных полимераз кроме 5′-3′-полимеразной активности имеют 3′-5′-экзонуклеазную активность, благодаря которой обеспечивается коррекция возможных ошибок. Причем эта коррекция осуществляется в два этапа: сначала идет проверка соответствия каждого нуклеотида матрице перед включением его в состав растущей цепи, а затем — перед включением в цепь следующего за ним нуклеотида. При встраивании неправильного нуклеотида двойная спираль деформируется. Это позволяет ДНК-полимеразе распознать в большинстве случаев дефект в растущей цепи. Если ошибочно встроенный нуклеотид не способен формировать водородную связь с комплементарным основанием, полимераза приостановит процесс репликации до тех пор, пока нужный нуклеотид не встанет на его место. У *E. coli* обнаружен ген *mutD*, мутация которого изменяет ε-субъединицу ДНК-полимеразы III, результатом чего является нарушение генетической репарации неправильно встроенных нуклеотидов, что в конечном итоге приводит к возникновению мутаций в других генах.

10.3. ЭКСЦИЗИОННАЯ РЕПАРАЦИЯ ДНК

Существуют системы генетической репарации, работа которых напоминает «хирургическое» вмешательство в структуру ДНК: поврежденные участки вырезаются из цепи ДНК, отсюда происходит и термин «*эксцизионная репарация*» (англ. *excision* — вырезание). Сам феномен известен еще с 1955 г., однако, молекулярный механизм эксцизионной репарации был раскрыт гораздо позже — в 1964 г., в результате работ нескольких групп исследователей на линиях мутантных бактерий, чувствительных к действию радиации. Оказалось, что данный тип генетической репарации обеспечивает вырезание неверного или поврежденного нуклеотида/участка ДНК, последующую синтез застройку бреши и лигирование. К этому типу относится несколько специализированных механизмов, например, гликозилазы удаляют лишь модифицированные основания, АР-эндонуклеазы — апуриновые сайты, и т.д. По-видимому, именно системы эксцизионной репарации восстанавливают большую часть повреждений ДНК в клетке.

Общая схема эксцизионной репарации, действующей по принципу «режь-латай», включает несколько этапов (см. рис. 10.1, *б*):

1. Узнавание повреждения УФ-эндонуклеазой (у *E.coli* этот фермент называют UvrABC-эндонуклеазой);

В случае пиримидиновых димеров или моноаддуктов повреждение распознается легко. В других случаях, например, при неправильном спаривании нуклеотидов, оба нуклеотида (правильный и неверный) эквивалентны для многих видов эксцизионной репарации, однако существуют специализированные системы, позволяющие в большинстве случаев восстанавливать нативную структуру.

2. Инцизия (надрезание) цепи ДНК этим ферментом по обе стороны от повреждения;

3. Эксцизия (вырезание и удаление) фрагмента ДНК, содержащего повреждение, происходит при участии геликазы – фермента, расплетающего молекулу ДНК для высвобождения концов после первичных надрезов;

4. Ресинтез, в ходе которого ДНК-полимераза I застраивает образовавшуюся брешь благодаря своей 5′-3′-полимеразной активности, а ДНК-лигаза ковалентно присоединяет 3′-конец вновь синтезированного материала к ранее синтезированной ДНК.

Эксцизионная репарация ДНК завершается при возникновении ковалентных связей репарированного участка со скелетом полинуклеотида. Таким образом, обеспечивается непрерывность в ранее поврежденной цепи двухцепочечной молекулы ДНК. В целом, эксцизионная репарация обычно распознает нарушения вторичной структуры ДНК (двойной спирали) и вырезает их.

У *E. coli* выделяют три вида эксцизионной репарации, различающихся по длине вырезаемых фрагментов поврежденной ДНК (короткие, длинные и очень короткие).

Эксцизионная репарация коротких фрагментов является конститутивной и контролируются системой *uvr*-генов (*A, B, C, D*). Размер вырезаемого фрагмента цепи ДНК составляет около 20 оснований. Комплекс UvrAB распознает повреждение (пиримидиновый димер, моноаддукт), затем UvrA отсоединяется, а UvrC присоединяется, новый комплекс осуществляет разрез на 7 нуклеотидов в 5′-сторону от повреждения и 3–4 нуклеотида в другую. *UvrD* продуцирует геликазу, которая раскручивает ДНК для высвобождения концов цепей. Этап эксцизии обычно осуществляется ДНК-полимеразой I, которая помимо полимеразной имеет и экзонуклеазную активность. Этот фермент, как правило, застраивает короткие участки (до 30 нуклеотидов). ДНК-полимераза II способна вырезать и застраивать более длинные бреши (до 1 000 -1 500 нуклеотидов). Такие же функции присущи экзонуклеазе VII. Таким образом, отдельные этапы могут выполняться различными ферментами, что повышает надежность системы. Данный тип репарации ДНК удаляет примерно 99% моноаддуктов.

Эксцизионная репарация длинных повреждений контролируется той же системой генов, однако, является индуцибельной. Размеры вырезаемых фрагментов в отдельных случаях могут превышать и 9 000 нуклеотидов.

К специализированным системам эксцизионной репарации ДНК можно отнести *эксцизионную репарацию очень коротких фрагментов*. Она специфически удаляет Т в парах GT и CT, используя продукты генов *mulL* и *mulS*. Другая система подобного рода, основанная на работе гена *mutY*, кодирующего аденингликозилазу, вырезает А в парах AG и AC. Эти системы могут работать очень успешно вскоре после синтеза ДНК.

10.3.1. ИСПРАВЛЕНИЕ ОШИБОК СПАРИВАНИЯ (МИСМЭТЧ-РЕПАРАЦИЯ)

Мисмэтч-репарация исправляет ошибки, возникающие в результате нарушения комплементарности пар AT или GC в дочерней цепи при включении в них некомп-

лементарных нуклеотидов. Особенность данного механизма состоит в том, что он способен отличить «старую» цепь ДНК от «новой» и исправить именно вновь синтезированную. В основе данного феномена лежит то важное свойство, что материнская цепь несет в последовательностях GATC аденины с присоединенными к ним сразу после окончания репликации метильными группами. Вследствие этого во время следующего цикла репликации материнская и дочерняя цепи становятся структурно различимыми, так как до окончания данного цикла дочерняя цепь остается неметилированной. Именно в этот временной промежуток и должны быть исправлены ошибки спаривания оснований. Генетическая репарация неспаренных оснований обнаружена в клетках и человека, и дрожжей. Механизм коррекции ошибок та-

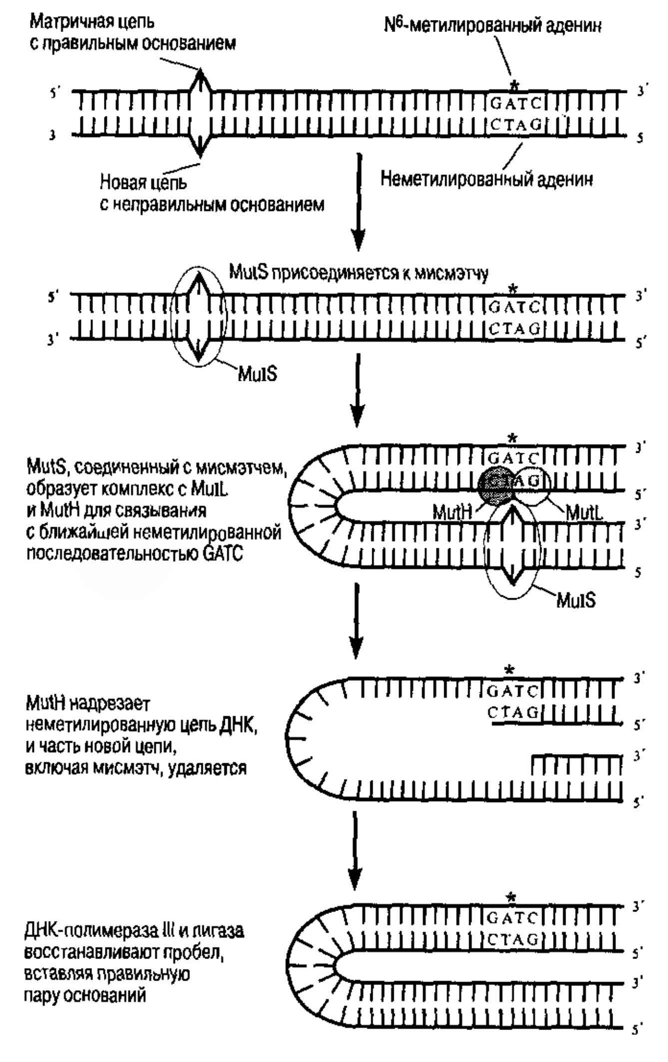


Рис. 10.2. Механизм мисмэтч-репарации. (Из: Жимулев, 2002)

кого типа, базирующийся на сочетанном действии продуктов четырех генов *mut* (*H*, *L*, *S* и *U*) и получивший название «система MutHSLU», достаточно хорошо изучен у *E. coli*. Такое взаимодействие протекает в несколько этапов, на первом из которых к паре некомплементарных оснований присоединяется MutS – белковый продукт гена *mutS*, распознающего нарушения такого типа (рис. 10.2). Соединившись с участком, включающим неправильное основание, этот белок сразу же образует комплекс и с продуктом гена *mutL*. Сформированный трехчленный комплекс активирует продукт гена *mutH* (до этого момента находившийся в латентном состоянии) для связывания с ближайшей неметилированной последовательностью GATC. Обладающий эндонуклеазной активностью продукт гена *mutH* может разрезать дочернюю цепь как с 5′-, так и с 3′-стороны от аденина. В первом случае к белку MutH присоединится экзонуклеаза, которая разрушит дочернюю цепь в направлении 5′-3′ до места неверного спаривания и несколько дальше. А во втором – другая экзонуклеаза, с 3′-5′-активностью, двигаясь по дочерней цепи ДНК, также разрушит ее ошибочный фрагмент. Дальнейший ход событий аналогичен описанным этапам ресинтеза и лигирования концов в ходе эксцизионной репарации. Механизм коррекции, при котором восстановлению подвергается определенная цепь ДНК, называется направленным.

Эксцизионная репарация обнаружена как у простейших, так и в культуре клеток млекопитающих. В частности в культуре клеток здоровых людей после облучения ее ультрафиолетом через 20 ч из ДНК исчезает до 90% тиминовых димеров (со скоростью около 40 000 димеров в час).

10.4. ПОСТРЕПЛИКАТИВНАЯ РЕПАРАЦИЯ ДНК

Пострепликативная репарация осуществляется в тех случаях, когда повреждение доживает до фазы репликации (слишком много повреждений, или повреждение возникло непосредственно перед репликацией) или имеет такую природу, которая делает невозможным его исправление с помощью эксцизионной репарации (например, сшивка цепей ДНК). Важная характеристика пострепликативной системы репарации – точность синтеза ДНК, не уступающая той, что наблюдается при обычной репликации.

Эта система играет особенно важную роль у эукариот, обеспечивая возможность копирования даже с поврежденной матрицы (хотя и с увеличенным количеством ошибок). Одна из разновидностей этого типа репарации ДНК - рекомбинационная репарация.

10.4.1. РЕКОМБИНАЦИОННАЯ РЕПАРАЦИЯ

Данный вариант пострепликативной репарации использует рекомбинацию для получения неповрежденной копии генетического материала. Этот тип репарации ДНК был открыт в клетках мутантов *E. coli*, неспособных выщеплять тиминовые димеры.

После действия ультрафиолета в таких клетках с помощью ДНК-полимеразы III синтезируется ДНК с одноцепочечными пробелами - брешами (рис. 10.1, *в*), которые исчезают при последующей инкубации клеток в питательной среде за счет рекомбинации между двумя сестринскими дуплексами. У *E. coli* эти обмены осуществляются с помощью продуктов генов rec (*A*, *B* и *C*). Кроме них, в заключительном этапе ресинтеза и сшивания участвуют ДНК-полимераза I и лигаза.

Механизм пострепликативной репарации ДНК, происходящей уже в первые минуты после облучения, наименее специфичен, так как отсутствует этап узнавания повреждения. Это быстрый способ восстановления нативной структуры, по крайней мере, части дочерних молекул ДНК. Таким образом, данная система позволяет полностью пройти процессу репликации на матрице поврежденной ДНК, но не удаляет повреждения: оно остается в исходных родительских цепях и может быть удалено на других этапах клеточного цикла, например, с помощью эксцизионной репарации.

10.4.2. SOS-РЕПАРАЦИЯ

Существуют системы генетической репарации, при которых точность синтеза невысока. Они являются индуцибельными, и, очевидно, обусловлены необходимостью синтеза ДНК даже на матрице, содержащей повреждения. При этом синтез ДНК на матрице, оставшейся неповрежденной, будет сопровождаться большим количеством ошибок. Индукцию процессов репарации, сопровождающуюся увеличением числа ошибок последней, обнаружил в 1953 г. Дж. Уэйгл (при заражении УФ-облученных клеток *E. coli* облученным же фагом λ). В честь первооткрывателя этот тип генетической репарации в 1974 г. М. Радман назвал W-реактивацией (*Weigle-reactivation*). W-реактивация дает возможность многим димерам пиримидина, возникающим в бактериальной клетке, дожить до периода синтеза ДНК. Хотя такая ДНК и содержит значительное количество ошибок, поврежденные клетки действительно «спасаются» на каком-то этапе, если только жизненно важные функции не оказались безнадежно нарушенными. Тогда же было показано, что реализация этого механизма возможна только при наличии продуктов генов *recA* и *lexA*. М. Радман в 1974 г. и Э. Виткин в 1975 г. сформулировали представления об индуцибельной системе генетической репарации, включающейся при появлении затруднений в синтезе ДНК, возникших вследствие сохранившихся димеров, число которых должно быть не менее 30-60. В связи со спасательными функциями этой системы репарации ДНК она была названа SOS-репарацией.

Таким образом, важная особенность прокариотических и эукариотических клеток состоит в их способности увеличивать эффективность генетической репарации при высокой дозе повреждений. Это возможно в результате индукции новой или модификации одной из пресуществующих ДНК-полимераз за счет белковых продуктов генов, активируемых повреждающими агентами. Например, появление таких ферментов в случае УФ-облучения обеспечивает трансдимерный синтез ДНК, в результате которого напротив тиминового димера будет находиться не брешь, а какой-либо нуклеотид. Разумеется, такая произвольная подстановка нуклеотида во вновь образующуюся цепь ДНК часто приводит к ошибкам репликации. В клетках *E. coli* сиг-

налом для индукции SOS-репарации служит замедление синтеза ДНК. Ответом на этот сигнал является ингибирование клеточного деления, индукция эксцизионной репарации с длинными вырезаемыми фрагментами и затем – рекомбинационной репарации. По-видимому, непосредственным стимулом к запуску механизмов SOS-репарации служит накопление одноцепочечных разрывов ДНК, индуцирующее протеазную активность белка RecA, который специфически взаимодействует с белком LexA репрессором для генов *rec* (*B, C, E, F, J*) и *uvrB*. Разрезание белка LexA приводит к снятию репрессии и запуску синтеза белковых продуктов указанных выше генов. Кроме того, разрезание белка LexA приводит к кратковременному увеличению его синтеза в клетке, поскольку данный белок является репрессором собственного гена (аутогенный контроль). Далее в результате работы репарационных систем происходит уменьшение количества одноцепочечных разрывов в ДНК, тем самым снижается индуцирующий SOS-репарацию сигнал, белок RecA теряет протеазную активность, и механизмы SOS-репарации выключаются.

10.5. РЕПАРАЦИЯ ДНК И НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ ЧЕЛОВЕКА

В 1964 г. была показана решающая роль эксцизионной репарации в восстановлении поврежденной ультрафиолетом ДНК *E. coli*. Было высказано предположение, что соответствующие механизмы у эукариот имеют более сложную организацию, поскольку призваны обеспечить более высокий уровень надежности. Уникальное значение систем репарации ДНК для нормального функционирования организма человека становится совершенно очевидным при анализе заболеваний обусловленных нарушением работы репарационных механизмов.

Классический пример такого рода болезней – **пигментная ксеродерма** (ХР, от англ. *Xeroderma pigmentosum*) – редкая, наследуемая по аутосомно-рецессивному типу патология. В результате повышенной чувствительности к солнечному свету (ультрафиолету) у больных уже в раннем возрасте появляются пигментация, сухость кожи, изъязвления, рубцы, а затем развивается рак кожи, включая меланомы и карциномы. Средний возраст появления первой опухоли у ХР-пациентов – 8 лет, а вероятность развития карцином слизистой рта в 20 000 раз превышает средние значения в популяции. Частота встречаемости заболевания в разных странах составляет от 1/250 000 человек до 1/40 000 человек. Показано, что у культивируемых фибробластов ХР-больных сокращается время жизни после УФ-облучения. Кроме того, выживаемость различных УФ-облученных вирусов, выращиваемых в культуре ХР-клеток, меньше, чем при их культивировании в нормальных клетках, что косвенно свидетельствует о дефектах систем восстановления от повреждений ДНК в ХР-клетках. Существенная особенность пигментной ксеродермы – наличие примерно у трети пациентов неврологических симптомов, обусловленных ранней гибелью нейронов, т.е. эксцизионная репарация играет важную роль в обеспечении продолжительности их жизни. Было

обнаружено, что в клетках XP-больных вырезание димеров у большинства пораженных, по-видимому, связано с нарушениями эксцизии или более ранней стадии – распознавания поврежденного участка. Выраженная гетерогенность XP (клинических различий между разными пациентами с данным заболеванием) может быть обусловлена возникновением дефектов либо в различных сайтах одного и того же гена, либо в генах, кодирующих разные полипептиды. Для решения этой проблемы использовали метод непарной клеточной гибридизации фибробластов от разных XP-больных. Анализ результатов был основан на том, что дочерняя гибридная клетка, может осуществлять эксцизионную репарацию, если дефекты ферментов репарации связаны с разными локусами. В таком случае наличие одного неповрежденного фермента обеспечивается одним геномом, а другого — вторым геномом, взаимно компенсируя дефекты. Если же ферментативные дефекты идентичны, то даже при повреждении разных сайтов одного гена, компенсация невозможна и гибридная дочерняя клетка будет иметь репарационный дефект. С помощью этого метода было идентифицировано 7 групп комплементации (7 различных локусов) в случае дефектов генов эксцизионной репарации XP (A, B, C, D, E, F, G), и 1 группа – связанная с дефектом пострепликативной репарации (около 20% среди всех больных пигментной ксеродермой), так называемая XP_{var}. Между группами комплементации, и даже внутри одной комплементационной группы наблюдаются выраженные клинические различия. Большинство генов, мутации которых вызывают пигментную ксеродерму, известны, и соответствующие белки по своим функциям в целом сходны с ферментами прокариотической эксцизионной репарации. Но частоты встречаемости разных групп комплементации в разных странах различны: в Европе наиболее распространена группа XPC, в Японии – XPA. Причем среди европейских пациентов не было обнаружено групп XPB и XPF, а в Японии при таком же отсутствии группы XPB группа XPF была представлена значительным количеством индивидов.

Продукт гена *XPA*, картированного в длинном плече девятой хромосомы (9q34.1), – это ДНК-связывающий белок, имеющий два цинковых «пальца». В облученных ультрафиолетом клетках ДНК-связывающие свойства этого белка усиливаются в 1000 раз. Показано, что для осуществления эксцизионной репарации необходимы С-конец и один из цинковых «пальцев». Белковым продуктом гена *XPB*, картированного в локусе q21 хромосомы 2 – (2q21), является геликаза, входящая в состав TFIIH-фактора транскрипции размером 89 кДа. Ген *XPC*, предварительно картированный на хромосоме 3, кодирует белок P125, функция которого пока не совсем ясна. Тем не менее, показано его участие совместно с полипептидом P58 в восстановлении репарационной активности. Ген *XPD*, подобно гену *XPB*, кодирует одну из субъединиц фактора транскрипции TFIIH размером около 87 кДа (общее число этих субъединиц не менее 5 и, вероятно, более 9). Ген *XPD* картирован в локусе (q13.2-q13.3) хромосомы 19; его белковый продукт имеет геликазную активность. Ген *XPF*, картированный в коротком плече хромосомы 16 – (16p13.13), по-видимому, продуцирует эндонуклеазу, надрезающую ДНК с 5′-стороны. А продуктом гена *XPG*, локализованного в длинном плече хромосомы 13 – (13q33), является эндонуклеаза, надрезающая ДНК с противоположной – 3′-стороны. Рис.10.3 отражает взаимодействие вышеописанных белковых продуктов в процессе эксцизионной репарации. Важно отметить, что повышенный риск новообразований уже в молодом возрасте, по ряду данных, свя-

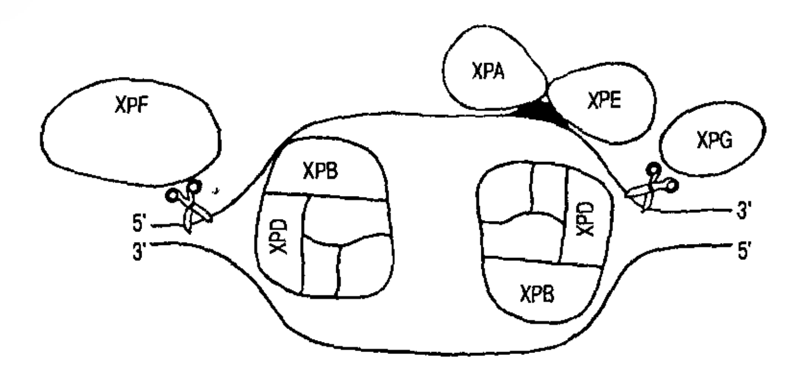


Рис. 10.3. Модель взаимодействия продуктов различных генов человека в процессе репарации ДНК-повреждений, вызванных УФ-облучением. (Из: Спивак, 1999)

зан с увеличением интенсивности УФ-излучения, вызывающим перегрузку эксцизионной системы репарации, которая успешно справляется с низким уровнем облучения. Так установлено, что для гетерозигот по пигментной ксеродерме вероятность возникновения рака кожи повышена на юге США, но не в других районах этой страны.

Установлено, что в клетках пациентов с XP_{var} пиримидиновые димеры удаляются с такой же скоростью и эффективностью, что и в клетках здоровых доноров, т.е. при внешних признаках болезни дефекты эксцизионной репарации не обнаруживаются. У таких больных выявляется другое нарушение – полная репликация поврежденных участков ДНК. Подобный дефект пострепликативной репарации наблюдается и в других группах больных XP, но в значительно меньшей степени. Таким образом, в случае XP_{var} превалирующим фактором является изменение параметров репликации ДНК.

Три из семи групп комплементации (XPB, XPD и XPG) могут иметь внешние признаки другого наследственного заболевания аутосомно-рецессивного **синдрома Коккейна (CS)**, в основе формирования которого лежат дефекты эндонуклеаз эксцизионного пути репарации. Синдром проявляется как карликовость при нормальном уровне гормонов роста. Кроме того, для больных характерны кальцификация костей черепа, атрофия зрительного нерва, глухота и ускоренное старение. Предположить дефект репарации у CS-пациентов позволила их необычная чувствительность к солнечному свету. Оказалось, что в культуре клеток больных с синдромом Коккейна наблюдается подавление синтеза РНК УФ-облучением (этот феномен стали в дальнейшем использовать для дифференциальной диагностики CS). Для данного синдрома были выявлены две группы комплементации – CSA и CSB. Упомянутые выше редкие случаи выявления признаков синдрома Коккейна у групп XPB, XPD и XPG рассматриваются отдельно и обозначаются как XPB/CS, XPD/CS и XPG/CS. Ген *CSA*, картированный на коротком плече хромосомы 5 в локусе (p12-p14), отвечает за синтез белка-переносчика, который входит в состав транскрипционного комплекса TFIIH, уже упоминавшегося в связи с белками XPB и XPD. Причем за связывание в комплексе отвечает N-конец белка CSA. Ген *CSB* локализован в длинном плече хромосомы 10 – (10q11.2). Белок CSB, являющийся его продуктом, имеет общие после-

довательности с фактором, связывающим транскрипцию и репарацию у *E. coli*, и, по-видимому, вместе с белком CSA участвует в привлечении белков эксцизионной репарации в район остановившейся транскрипции. Данное предположение базируется на имеющихся в достаточном количестве наблюдениях, подтверждающих сопряженные дефекты генетической репарации и транскрипции при CS. В 80-х годах Н. Ханавалт описал так называемую *преимущественную репарацию ДНК*. Этот феномен состоит в более быстром удалении отдельных типов повреждений ДНК из многих (но не изо всех) транскрипционно-активных генов по сравнению с транскрипционно-неактивными (предполагается, что у TFIIH-фактора транскрипции существуют две формы: в транскрипции участвует холо-форма, в репарации - репаросома). Было показано, что у облученных ультрафиолетом CS-клеток отсутствует преимущественная репарация ДНК. При этом в них снижена скорость репарации как молчащих (нетранскрибируемых), так и транскрипционно-активных участков генома. Накопленные наблюдения, подтверждающие наличие при CS сопряженного дефекта репарации и транскрипции, позволяют предполагать, что причина большинства тех тяжелых симптомов у CS-пациентов, которые не удается объяснить только нарушением репарации ДНК, кроется в снижении уровня и нарушении последовательности транскрипции в онтогенезе.

Третье заболевание, характеризующееся повышенной фоточувствительностью ДНК у его носителей (примерно у половины) - это наследуемая по аутосомно-рецессивному типу **трихотиодистрофия (TTD)**. Важнейший диагностический признак TTD специфическая ломкость волос, обусловленная уменьшением содержания в них низкомолекулярных богатых серой белков. К этому основному клиническому проявлению следует добавить аномалии зубов и кожи, ихтиоз, дефекты полового развития, часто наблюдающиеся умственную и физическую отсталость, а также повышенную предрасположенность к раку кожи. Специфический паттерн волос при микроскопировании характеризуется чередованием темных и светлых полос (напоминает тигровый хвост). Белки с высоким содержанием серы в таких волосах претерпевают не только количественные, но и качественные изменения. Они содержат меньше цистеина и имеют сильно измененный аминокислотный состав. Исследование в культуре клеток фоточувствительных пациентов с TTD показало, что дефект репарации в них соответствует дефекту уже рассмотренного белка XPD. Кроме того установлено, что часть фоточувствительных клеточных линий комплементирует как с XPD, так и с XP (A, C, E, F и G), а также восстанавливает свои репарационные функции при микроинъекции белка XPB. Среди больных TTD, страдающих повышенной фоточувствительностью, обнаружены индивиды, в культивируемых клетках которых вообще отсутствует комплементация с клетками XP. Это обстоятельство послужило стимулом для интенсивного изучения гена *XPD* у пациентов с пигментной ксеродермой и с трихитиодистрофией. Результатом проведенных исследований стала гипотетическая схема, предложенная в 1990 г. Б. Броутоном с соавторами (рис. 10.4.). Согласно этой гипотезе, ген *XPD* полифункционален, а продукт принимает участие как в эксцизионной репарации, так и в РНК-полимераза II-зависимой транскрипции. В дальнейшем было показано, что, кроме белков XPB и XPD, в основе клинических проявлений может быть задействован еще один компонент транскрипционного комплекса TFIIH, состоящий их трех субъединиц. Кроме того, выяв-

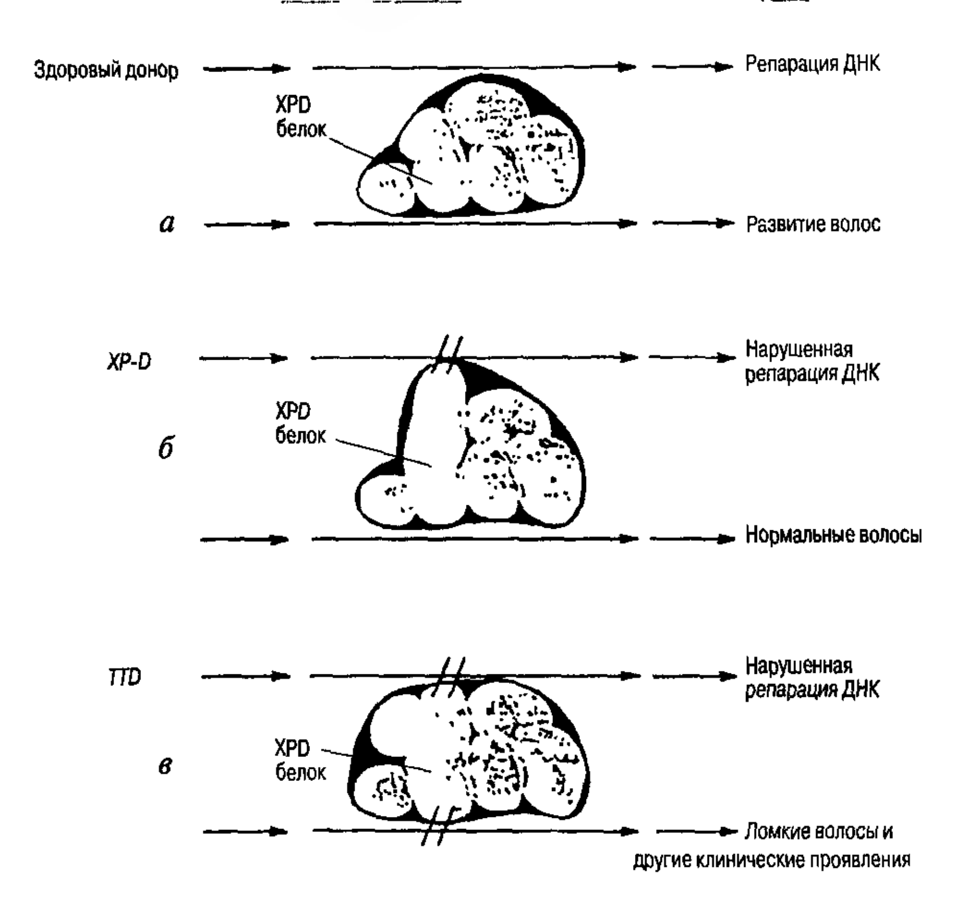


Рис. 10.4. *Гипотетическая схема транскрипционного дефекта при TTD. (Из: Спивак, 1999)*

а – основной транскрипционный комплекс человека TFIIH, содержащий несколько субъединиц; *б – некая мутация инактивирует только ту фракцию XPD, которая связана с эксцизионной* репарацией ДНК и приводит к проявлению типичной XP; в – другие мутации могут как инактивировать функцию эксцизионной репарации ДНК, так и/или изменять уровень транскрипции одного или нескольких определенных генов, следствием чего является клиническое разнообразие TTD

ление большого количества TTD-пациентов, не страдающих повышенной фоточувствительностью, свидетельствует о наличии еще одной, четвертой, субъединицы TFIIH. Всесторонний анализ всех полипептидных компонентов транскрипционного комплекса TFIIH поможет определить роль каждого из них в формировании всевозможных комбинаций из перечисленных выше клинических признаков.

Изучение эксцизионной репарации, проводившееся в течение последних 40 лет, показало, что у эукариот в целом она организована сходным образом. Описаны многие гены, ответственные за синтез и работу ферментов репарации ДНК после УФ-облучения. Мутации в этих генах приводят к развитию патологических признаков при целом ряде наследственных заболеваний, сопровождающихся снижением средней

продолжительности жизни. Нарушения в работе репаративных ферментов значительно увеличивают риск развития онкологических заболеваний у человека.

Механизмы генетической репарации после действия ионизирующей радиации изучены значительно хуже, в первую очередь, вследствие большого разнообразия типов индуцированных радиацией повреждений ДНК. Однако значительная часть этих повреждений устраняется с помощью системы эксцизионной репарации. Но в ликвидации двухцепочечных разрывов используются другие механизмы, а именно — мейотической рекомбинации (см. разд. 10.4 и 11.1.3). В настоящее время возможности изучения таких механизмов у человека практически ограничены исследованиями клеток больных атаксией-телеангиэктазией.

Атаксия-телеангиэктазия (АТ), или синдром Луи—Бар, — аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся мозжечковой атаксией (расстройством координации движений), телеангиэктазами (локальным чрезмерным расширением мелких сосудов), различными формами иммуннодефицита, предраеположенностью к онкологическим заболеваниям. Частота синдрома составляет от 1/100 000 до 1/40 000 человек. Пациенты, как правило, не доживают до 50 лет.

Немаловажно, что при АТ наблюдается повышенная частота спонтанных и индуцированных хромосомных перестроек в соматических клетках, а также повышенный уровень общей хромосомной нестабильности в лимфоцитах. Хромосомы этих больных имеют значительно укороченные теломеры (примерно втрое по сравнению с теломерами здоровых доноров). В 1995 г. П. Гринвелл установил, что ген *TEL1 Saccharomyces cerevisiae*, ответственный за укорочение теломер у дрожжей, является гомологом гена *АТ — atm* (*AT-mutated*). Клетки всех без исключения изученных до сих пор больных АТ аномально чувствительны к воздействию ионизирующей радиации и радиомиметиков (химических веществ, имитирующих действие ионизирующего излучения). Это проявляется в пониженной выживаемости клеток и повышенном уровне хромосомных аномалий. Характерная особенность соматических клеток больных АТ — радиорезистентность синтеза ДНК. Последнее свойство очень важно, т.к. помогает понять молекулярный механизм возникновения болезни. В норме в клеточном цикле существуют две точки задержки клеточного деления в случае возникновения значительных повреждений ДНК: G1-S и G2-M. Эти остановки необходимы для исправления повреждений ДНК. У больных атаксией-телеангиэктазией клетки не останавливаются перед фазой синтеза ДНК и, следовательно, у них нет времени для репарирования повреждений ДНК. Как полагает ряд исследователей, одна из причин данного феномена кроется в том, что ключевой белок P53, в норме отвечающий за упомянутую выше остановку, не индуцируется при наличии повреждений.

Синдром Блума (пропорциональная пре- и постнатальная задержка роста, чувствительность к ультрафиолету солнечных лучей, гипо- и гиперпигментированная кожа, характерная краснота на лице в виде бабочки, предрасположенность к онкологическим заболеваниям и хромосомная нестабильность) также наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Клетки больных с синдромом Блума характеризуются высоким уровнем спонтанных хромосомных аберраций и сестринских хроматидных обменов (СХО). Заболевание обусловлено мутациями в гене *BLM* (*Bloom-mutated*), кодирующем белок, сходный с RecQ-геликазой *E. coli*. Этот белок у *E. coli* является уча-

стником RecF-рекомбинационного пути. Ген *BLM* картирован на хромосоме 15 в локусе q26.1, в той же области, где локализован протоонкоген *fes*. Предполагается, что ген имеет ДНК-зависимую АТРазную активность и ДНК-геликазную активность. С негеликазной частью исследователи связывают функцию поддержания стабильности хромосом в клетках, а ДНК-геликазной части белка BLM отводят ключевую роль на некоторых этапах репарации.

Известны и другие нозологические формы, клинические проявления которых тоже связывают с дефектами репарации ДНК, но уже безотносительно ионизирующего или УФ-облучения. К таким заболеваниям относятся анемия Фанкони и прогерии – синдромы Вернера и Хатчинсона–Гилфорда.

В случае **анемии Фанкони (FA)**, наследующейся по аутосомно-рецессивному типу и характеризующейся поражением всех элементов костного мозга (и как следствие – снижением количества всех клеточных элементов крови), наблюдается нарушение вырезания пиримидиновых димеров, а также нарушение репарации межцепочечных сшивок ДНК. У больных FA и их кровных родственников установлена повышенная частота новообразований. Частота острой миелоидной лейкемии в у FA-пациентов превышает популяционную среднюю в 15 000 раз. Клетки этих больных характеризуются сниженной выживаемостью после воздействия химических агентов, вызывающих поперечные сшивки цепей ДНК, и отсутствием такого эффекта в ответ на действие γ-/УФ-лучей. Кроме того, фаза G2 в FA-клетках продолжается в 2 раза дольше, чем в клетках здоровых доноров, что до сих пор не получило объяснения. Для FA выделено 8 групп комплементации (A-H), из которых для двух идентифицированы гены – *FAA* и *FAC* (ген картирован на длинном плече хромосомы 9 в локусе q22.3). Возможно, белковые продукты этих генов представляют собой часть сложной репарационой системы, но сам дефект репарации не является первичным для сложного фенотипа FA.

Прогерии – это заболевания, основным нозологическим признаком которых является преждевременное старение. По отношению к началу процесса старения (до или после полового созревания) выделяют две основные формы – синдром Хатчинсона–Гилфорда и синдром Вернера.

Синдром Хатчинсона–Гилфорда, или прогерия детей, – крайне редкое заболевание. Его частота составляет 1 на 1 000 000 человек. Именно этот синдром занесен под названием прогерии в OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) – электронную версию каталога В. Маккьюсика, а также в POSSUM и Oxford Medical Database – ведущие компьютерные базы данных по наследственной патологии. Фенотип пациентов чрезвычайно характерный: маленький рост, «птичье» лицо с клювообразным профилем, преобладание размеров мозговой части черепа над лицевой, выступающая венозная сеть на коже мозговой части, как правило, обнаженной вследствие алопеции, часто тотальной, с выпадением бровей и ресниц. Наблюдается резкая гипоплазия ключиц, дефекты формы/числа зубов, сухая истонченная кожа, практически полное отсутствие подкожной жировой клетчатки, отставание в развитии, особенно физическом. Больные бесплодны, хотя в литературе описан случай рождения ребенка у пациентки с синдромом Хатчинсона–Гилфорда. В крови повышен уровень Средняя продолжительность жизни описанных носителей синдрома – 13,4 лет (как редкое наблюдение описан единственный 45-летний пациент). Причиной смерти,

как правило, служит инфаркт миокарда, с выявлением на аутопсии генерализованного атеросклероза и фиброза миокарда, а также отложения жироподобного вещества в тканях мозга и паренхиматозных органов.

Репарация ДНК при синдроме Хатчинсона Гилфорда нарушена: установлено, что клетки его носителей не способны избавляться от вызываемых химическими агентами сшивок ДНК-белок. Но главная диагностическая особенность клеток больных с данным синдромом состоит в резко сниженном, по сравнению с нормой, количестве делений, которое способны пройти клетки в культуре (так называемый лимит, или число Хейфлика). В 1971 г. А.М. Оловников высказал предположение об укорочении хромосомных теломер в процессе развития клеток. А в 1992 г. было показано, что для клеток пациентов с синдромом Хатчинсона–Гилфорда характерно врожденное укорочение теломер. Анализ взаимосвязи между лимитом Хейфлика, длиной теломер и активностью теломеразы (фермента, способного наращивать 3'-конец теломерной ДНК) дает возможность соотнести естественное старение и процесс формирования клинической картины при синдроме Хатчинсона–Гилфорда.

Крайне низкая частота встречаемости данной формы прогерии позволяет лишь высказывать гипотезы о типе наследования. Аутосомно-рецессивный тип предполагается по аналогии с синдромом Коккейна, имеющим отдельные черты преждевременного старения. Но есть и предположение о развитии синдрома Хатчинсона–Гилфорда вследствие доминантной аутосомной мутации, возникшей *de novo*. Оно получило косвенное подтверждение на основе измерения теломер у носителей синдрома, их родителей и здоровых доноров. Было показано, существенное укорочение теломер у больных по сравнению с другими двумя испытуемыми группами.

Синдром Вернера (WS), или прогерия взрослых, также характеризуется симптомами преждевременного старения, но возникающими уже после завершения полового созревания. Пациенты седеют и теряют волосы еще в возрасте до 20 лет. Появляются старческие изменения кожи (морщины, гиперпигментация, сухость, гиперкератоз, телеангиэктазии), голос утрачивает звонкость. Кроме того, наблюдается широкий спектр патологии, сопровождающей обычное старение: атеросклероз, остеопороз, катаракта, диабет, различные типы доброкачественных и злокачественных опухолей. Отмеченный высокий уровень гиалуроновой кислоты в моче совпадает с таковым и в случае вышеописанной прогерии Хатчинсона–Гилфорда. Аналогичная картина наблюдается и в отношении лимита Хейфлика. Клетки больных WS исчерпывают свой пролиферативный потенциал в 3-5 раз быстрее, чем у здоровых доноров, но растут значительно медленнее нормальных (заметим, что продолжительность клеточного цикла в случае прогерии Хатчинсона–Гилфорда соответствует норме). Отсутствие врожденного феномена укороченных теломер у больных WS — еще один признак, по которому разнятся эти две формы прогерии. Вследствие этого уменьшенный лимит Хейфлика у больных WS связывают с нарушением регуляции остановки клеточных делений при укорочении теломер до определенного уровня. Хотя WS и является достаточно редко встречающимся аутосомно-рецессивным заболеванием, его частота в Японии составляет 1 на 40 000 человек, что на два порядка выше, чем для синдрома Хатчинсона–Гилфорда. Ген, ответственный за прогерию взрослых и названный *WRN*, картирован в локусе (p12-p21) хромосомы 8. Продуцируемый им белок WRN выполняет функцию геликазы, но в отличие от XPB, XPD и

CSB его активность, по-видимому, не вовлечена в процесс репарации ДНК, связанный с транскрипцией: WRN не входит в основной транскрипционный комплекс человека TFIIH.

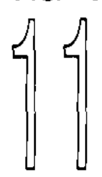
Многие из патологических симптомов синдрома Вернера сходны с теми, что наблюдаются в процессе нормального старения, но есть и отличия. Так соотношение количества эпителиальных и неэпителиальных опухолей у пациентов с WS составляет 1:1, а в общей популяции – 10:1. Кроме того, по сравнению с общей популяцией, реже наблюдаются гипертензия и поражения центральной нервной системы.

Синдром Вернера и *описанные выше пигментная* ксеродерма, анемия Фанкони, атаксия-телеангиэктазия и синдром Блума объединены общим признаком – генетически детерминированной нестабильностью хромосом. Этот феномен выражается в постоянном, возникающем спонтанно или под действием некоторых агентов, изменении структуры хромосом, их отдельных локусов или групп локусов. Результатом являются мутации соматических клеток и злокачественные новообразования.

Отдельные нарушения работы систем репарации имеют место и при более распространенных заболеваниях – системных (ревматоидный артрит, системная красная волчанка и др.), некоторых нейродегенеративных (например, при болезни Альцгеймера) и онкологических заболеваниях.

В 1994 г. было показано, что мутации в гене *MSH2* у человека, сходном с аналогичными генами у *S. cerevisae* и геном *mutS* у *E. coli*, приводят к нарушению репарации одного из типов репликативных ошибок – неправильно спаренных оснований вследствие небольших делеций (утрат) или инсерций (вставок). Мутация в одной из копий этого гена с высокой вероятностью детерминирует развитие некоторых видов новообразований: семейного неполипозного рака кишечника (HNPCC) и рака эндометрия. В опухолевых клетках потеряна вторая копия гена, и наблюдается высокая мутабильность микросателлитных повторов (возрастающая, по крайней мере, в 100 раз). По аналогии были найдены еще несколько генов, один из которых, *MLH1* гомологичен *mutL* гену у бактерий. Мутации в этом гене также приводят к развитию неполипозного рака кишечника. Таким образом, существует принципиальное сходство некоторых систем репарации у про- и эукариот.

глава



МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ

Комбинативная изменчивость имеет две основные составляющие: 1) случайное, равновероятное расхождение хромосом в мейозе (оно обеспечивает перекомбинацию родительских хромосом и служит цитологическим обоснованием закона свободного комбинирования, сформулированного Г. Менделем) и 2) рекомбинация сцепленных генов, локализованных в гомологичных хромосомах. В более узком смысле под рекомбинацией подразумевают перекомбинацию генов, и потому предпосылкой для нее, в частности, и для комбинативной изменчивости вообще, является гетерозиготность организма по одному или более генам. Эта гетерозиготность, а следовательно, и рекомбинация возникают у эу- и прокариот разными путями: для их реализации у прокариот существуют конъюгация, трансформация и трансдукция, а также – совместная инфекция (у вирусов). У эукариот гетерозиготность обеспечивается диплоидностью генома, а сама рекомбинация может происходить как в половых, так и в соматических клетках. Результатом рекомбинации в конечном итоге является перенос участков ДНК с одной молекулы на другую. В случае реципрокной рекомбинации этот перенос – взаимный, а при нереципрокной – односторонний.

Существуют два подхода к изучению процесса рекомбинации. Первый из них, *классический*, анализирует наследование признаков и, если признаки имеют тенденцию наследоваться совместно, оценивает степень их сцепления, или частоту рекомбинации между соответствующими локусами (см. гл. 7). Этот подход возник в «домолекулярное» время и представляет собой статистический анализ наблюдаемого расхождения признаков при передаче их последующим поколениям. Второй подход к изучению генетической рекомбинации, молекулярный, направлен на анализ тонких механизмов этого процесса. Хотя для обоих подходов предметом исследования является один и тот же процесс, само понятие генетической рекомбинации неоднозначно.

Можно выделить три типа рекомбинации:

- *общую* (происходит между гомологичными последовательностями ДНК; это – рекомбинация между гомологичными хроматидами в мейозе, реже – в митозе);
- *сайт-специфическую* (затрагивает молекулы ДНК, характеризующиеся ограниченным структурным сходством, и наблюдается при интеграции фагового генома в бактериальную хромосому);
- *незаконную* (происходит во время транспозиции, не основанной на гомологии последовательностей ДНК).

11.1. ОБЩАЯ, ИЛИ ГОМОЛОГИЧНАЯ, РЕКОМБИНАЦИЯ

Примером является мейотическая рекомбинация (кроссинговер) у эукариот, которая происходит в клетках после репликации, в профазе первого мейотического деления. Во время лептотены хромосомы конденсируются и становятся видимыми. В каждой из них после репликации дуплексная ДНК представлена двумя сестринскими хроматидами. Под электронным микроскопом видно, что на стадии лептотены пара сестринских хроматид каждой хромосомы формирует единый *осевой элемент*. Установлено, что у млекопитающих он состоит из белков SCP2 и SCP3 (от англ. *synaptonemal complex proteins*). На следующей стадии, зиготене, гомологичные хромосомы начинают соприкасаться друг с другом (конъюгировать) на отдельных, пока еще коротких участках. Одновременно осевые элементы гомологичных хромосом начинают соединяться попарно с помощью белка SCP1, который протягивается поперек между ними в виде субмикроскопических волокон (филамент). По завершении конъюгации, на стадии пахитены гомологичные хромосомы оказываются объединенными в биваленты по всей длине за счет специфической структуры, состоящей из двух продольных белковых тяжей. Это – так называемые *латеральные элементы*, в состав которых входят осевые элементы с прикрепленными к ним, петлеобразно уложенными фибриллами хроматина сестринских хроматид. Латеральные элементы соединены между собой поперечными белковыми волокнами, которые в совокупности формируют третью продольную структуру – *центральный элемент*. Из двух латеральных и одного центрального элемента образуется электроноплотная трехполосная структура, так называемый, **синаптонемный комплекс** (рис. 11.1), в котором гомологичные хромосомы прилегают к латеральным элементам с двух сторон, и этот контакт происходит «точечно» (в местах прикрепления петель к синаптонемному комплексу по всей его длине). Функциональное значение этой структуры, напоминающей застежку «молнию», состоит в том, что, с одной стороны, она не дает конъюгирующим

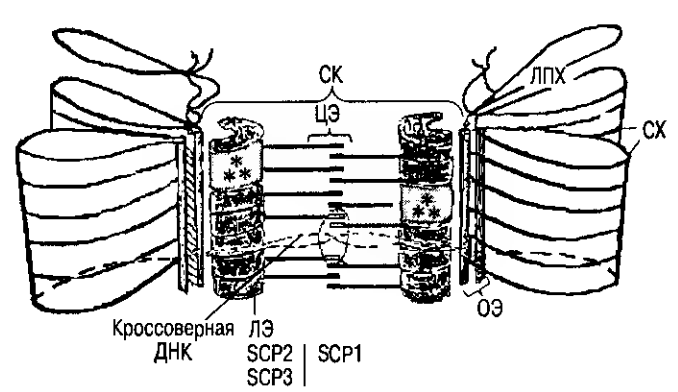


Рис. 11.1. Гипотетическая схема строения синаптонемного комплекса млекопитающих. (Из: Богданов, 2000)

Обозначения: СК – синаптонемный комплекс; ЦЭ – центральный элемент; ЛЭ – латеральный элемент; ОЭ – осевые элементы, входящие в состав ЛЭ; СХ – сестринские хроматиды; ЛПХ – латеральные петли хроматина; SCP1, 2, 3 – белки, формирующие структурные элементы синаптонемного

мосомам необратимо слипнуться, а с другой стороны – закрепляет их в строго гомо-ичном относительно локализованных на них генах взаиморасположении. В зависи-ти от размера генома у разных видов могут варьировать размеры синаптонемного плекса: общая ширина его трехполосной ленты составляет от 76 до 240 нм, а длина ветствует также видоспецифичной длине бивалентов в профазе I мейоза.

На стадии диплотены гомологичные хромосомы бивалентов начинают расхо-ься, но обнаруживается, что несестринские хроматиды в биваленте остаются сце-нными в некоторых точках, образуя фигуру, получившую название **хиазмы.** На ии диакинеза хромосомы конденсируются путем спирализации, а хиазмы вследст-отталкивания гомологов начинают сдвигаться к краям хромосом. В этот момент все ре хроматиды становятся видимыми. Это – прямые наблюдения, и они позволяют ать некоторые предположения о процессе рекомбинации.

Профаза первого деления мейоза – единственный момент, когда гомологичные хро-омы образуют комплекс друг с другом, что, является условием, необходимым для осу-твления рекомбинации. Можно полагать, что именно в обеспечении рекомбинации стоит суть синапса – образование синаптонемного комплекса, временной структуры, орая формируется на стадии зиготены и разрушается в диплотене. Согласно мнению оров приведенной выше гипотетической схемы, синаптонемный комплекс «...необхо-*для организации хроматина в виде серии латеральных петель, основания которых со-ны в линейную последовательность на поверхности его латеральных элементов и до-ны для узнавания гомологичных локусов и кроссинговера».* Существует очень прав-подобная, но до настоящего времени не всеми исследователями разделяемая гипотеза, хиазмы представляют собой места прохождения рекомбинаций – ведь количество тех ругих примерно совпадает. Это позволяет локализовать время происхождения процес-рекомбинаций, и считать, что даже на стадии диакинеза в местах рекомбинации хро-омы все еще остаются связанными посредством нитей ДНК.

11.1.1. МОДЕЛЬ ХОЛЛИДЕЯ

блюдая в микроскоп хиазмы, анализируя их строение, можно предположить, что оцесс рекомбинации начинается с образования двух одноцепочечных разрывов в ных молекулах ДНК. Именно такую гипотезу высказал Робин Холлидей, предло-вший в 1964 г. стройную и изящную модель рекомбинационных процессов у эука-от, основанную на принципе «разрыв-воссоединение пар гомологичных молекул К». Согласно этой модели необходимым этапом рекомбинации является **конъю-ция,** т.е. попарное сближение сестринских хроматид гомологичных хромосом с об-ованием взаимостабильных структур – **бивалентов**, при котором может происхо-ть обмен генетическим материалом.

Процесс обмена одноцепочечными участками между родительскими нитями К состоит из нескольких этапов (рис. 11.2):

Формирование структуры Холлидея.

1. После репликации ДНК и, следовательно, удвоения хромосом, в ранней про-зе мейоза наблюдается попарное сближение сестринских хроматид гомологичных омосом с образованием бивалентов (т.е. конъюгация).

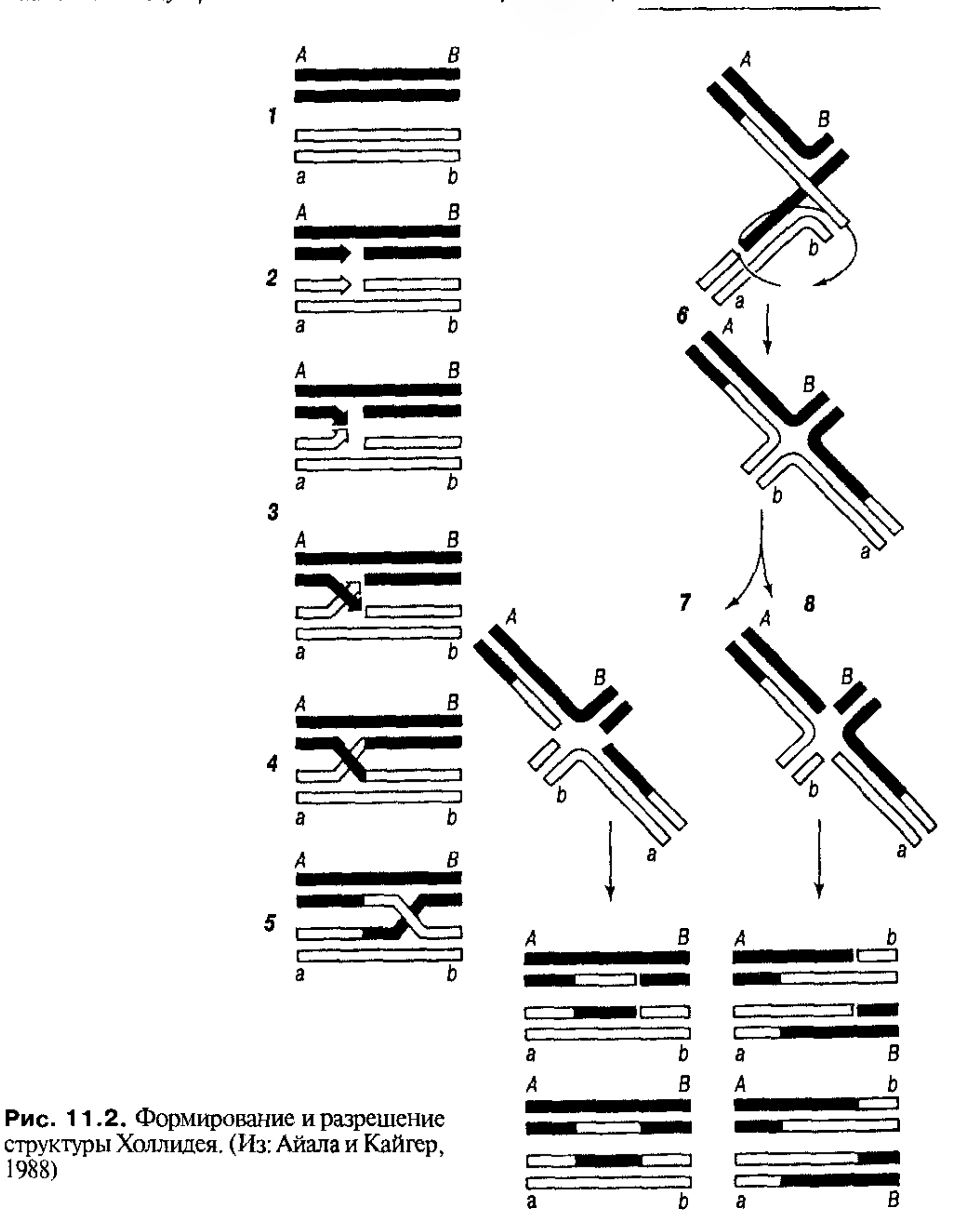


Рис. 11.2. Формирование и разрешение структуры Холлидея. (Из: Айала и Кайгер, 1988)

2. В каждой молекуле ДНК на двух сближенных гомологичных участках несестринских хроматид фермент никаза делает симметричные одноцепочечные разрезы.

3. Свободные концы цепей около разрывов отделяются от комплементарных партнеров и перебрасываются на бреши, образовавшиеся в гомологичных молекулах ДНК.

4. Концы переброшенных цепей лигируются с концами цепей реципиентных молекул ДНК, при этом образуется **крестообразная структура Холлидея** с гибридным районом, *гетеродуплексом*. Таким образом, две претерпевшие рекомбинацию хроматиды состоят в области концевых отделов из родительских цепей ДНК, а в середине – из участков, полученных от противоположных родительских молекул.

5. Центр структуры Холлидея, состоящей из двух полухиазм, может перемещаться вдоль спаренных цепей ДНК подобно замку застежки «молния», размыкая водородные связи между комплементарными основаниями внутри одной родительской молекулы ДНК и замыкая соответствующие связи между основаниями цепей из двух разных молекул ДНК. В результате такой миграции полухиазм в обеих родительских молекулах ДНК могут образовываться протяженные гетеродуплексные участки (у дрожжей зона гибридной ДНК достигает 1 000 п.н).

Разрешение структуры Холлидея.

6. Структура Холлидея, состоящая из двух пар цепей (одна пара пересекающихся, другая - непересекающихся), спонтанно и под контролем может подвергаться изомеризации. Чтобы восстановить биспиральную структуру обеих молекул ДНК и таким образом закончить процесс их коньюгации, пересекающиеся цепи должны быть разрезаны. Еще одна изомеризация с поворотом одной из полухиазм вокруг точки перекреста на 180° приводит к образованию второй изомерной формы структуры Холлидея.

7. При разрезании полученного изомера по горизонтальной оси (в цепях, претерпевших обмен) две образовавшиеся молекулы ДНК не являются рекомбинантными по родительским маркерам (AB и ab), фланкирующим область перекреста, но обе содержат по гетеродуплексному участку.

8. При разрезании по вертикальной оси (в интактных цепях) образовавшиеся линейные молекулы рекомбинантны по родительским генетическим маркерам, расположенным по обеим сторонам от гетеродуплексного участка ДНК.

Этапы 7 и 8 завершаются лигированием концов фрагментов, составляющих рекомбинантные и нерекомбинантные молекулы. Интенсивное изучение рекомбинации у бактерий сделало более понятной молекулярную организацию некоторых ее этапов. Установлено, что гомологичная рекомбинация у *E.coli* контролируется генами *recA*, *B*, *C* и *D*. Идентифицированы ферменты, являющиеся белковыми продуктами этих генов. Долгое время полагали, что ключевую роль в обеспечении всех процессов общей рекомбинации у *E. coli* играет белок RecA. Во-первых, он участвует в расплетании двойной спирали, способствуя коньюгации молекул ДНК, стабилизации свободных концов и взаимодействию рекомбинирующих комплементарных цепей. Во-вторых, белок RecA катализирует переориентацию цепей с образованием структуры Холлидея и дальнейшей миграцией полухиазм. Вполне вероятно, что белок RecA в условиях его повышенной продукции непосредственно участвует в репарации, направляя рекомбинацию между поврежденными и неповрежденными участками молекул ДНК. Накопленные экспериментальные данные позволяют заключить, что промежуточным этапом рекомбинации у *E. coli* также является формирование и разрешение структур Холлидея. Таким образом, модель, изначально предложенная для объяснения молекулярного механизма рекомбинации у эукариот, казалась применимой и к прокариотам. Это позволяет предполагать значительное сходство процессов рекомбинации у тех и у других. Действительно, у дрожжей обнаруживаются гены, сходные с *recA*.

Функции генов *recB*, *recC* и *recD* стали проясняться лишь в последние годы. В настоящее время известно, что продукты именно этих генов играют ведущую роль в формировании свободных концов, т.е. именно они опосредуют начальный этап рекомбинации. При этом каждая из трех субъединиц комплекса функционирует высоко специфично. Об этом свидетельствует тот факт, что мутанты *recB*, *recC* и *recD* обладают разными свойствами: у штаммов *recB* и *recC* резко снижена частота рекомбинации и повышена чувствительность к ДНК-повреждающим агентам. Кроме того они характеризуются низкой выживаемостью. Все это свидетельствует об их неспособности репарировать повреждения ДНК путем гомологичной рекомбинации. Мутанты *recD* по выживаемости не отличаются от штаммов дикого типа, следовательно, рекомбинационный путь репарации у них не нарушен.

У бактерий получено много мутантов, неспособных к рекомбинации, и идентифицировано 10-20 соответствующих локусов. Очевидно, даже у прокариот рекомбинация представлена различными системами, которые контролируются специфическими генами и функционируют в определенных условиях. Однако, во всех случаях, идет ли речь о традиционной рекомбинации, связанной с конъюгацией бактерий, или о рекомбинации, инициируемой повреждениями ДНК (как в случае пострепликативной репарации), или о рекомбинации с фаговым геномом, необходимыми предпосылками рекомбинации являются три момента. Это – образование одноцепочечного участка, образование свободного 3'-конца, а, кроме того, одноцепочный участок и свободный 3'-конец должны быть в области гомологии одноцепочечной и двухцепочечной ДНК.

11.1.2. МОДЕЛЬ МЕЗЕЛЬСОНА-РЭДДИНГА

Один из не укладывающихся в модель Холлидея фактов – асимметричный обмен цепями ДНК, наблюдающийся у ряда грибов Ascomycetes. Для устранения этого несоответствия в середине 70-х годов теперь уже прошлого XX века М. Мезельсон и К. Рэддинг модифицировали модель Холлидея, предположив, что в начале рекомбинации гетеродуплексный участок образуется не на двух, а только на одной молекуле ДНК. Основные принципы функционирования этой модели представлены схематически на рис. 11.3.

1. После образования одноцепочечного разрыва в ДНК одной хроматиды происходит репарационный синтез и вытеснение свободного конца разорванной цепи.

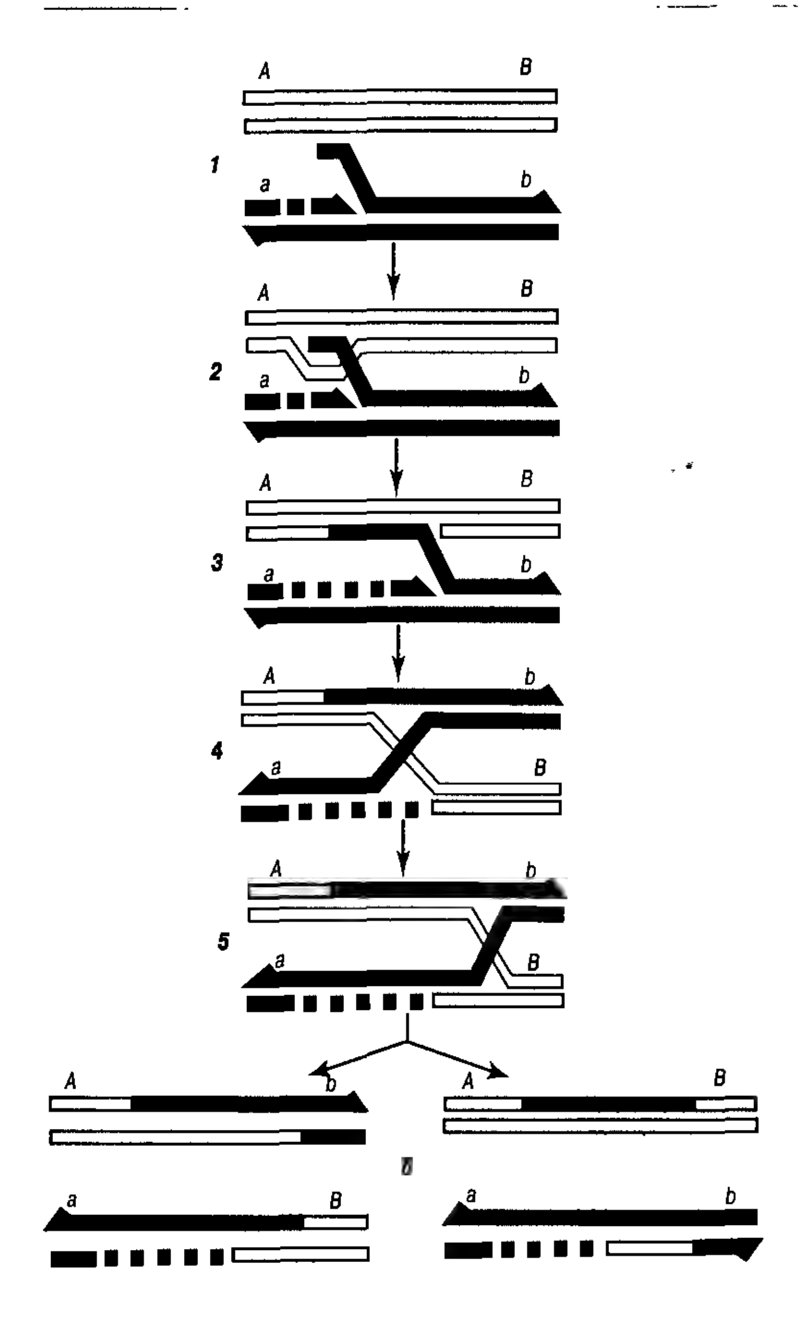
2. Вытесняемый конец внедряется в структуру двойной спирали партнера, в свою очередь, вытесняя там участок одной из ее цепей, в результате чего образуется петля.

3. Петля расщепляется нуклеазами, и с концом, образовавшимся при ее деградации, ковалентно соединяется конец внедрившейся цепи. В то же время в ДНК, претерпевшей одноцепочечный разрыв, как результат репарационного синтеза формируется асимметричный гетеродуплекс.

4. Изомеризация приводит к образованию структуры Холлидея.

5. Миграция полухиазм порождает симметричные участки гетеродуплексной ДНК в обоих партнерах.

6. Разрешение структуры Холлидея при расщеплении в области перекреста может завершиться рекомбинацией фланкирующих маркеров или сохранением типа сцепления, характерного для родительских молекул ДНК.



ис. 11.3. Модель Мезельсона-Рэддинга. (Из: Айала, Кайгер, 1988)

С помощью этой модификации исходной модели Холлидея можно объяснить ольшинство результатов не только рекомбинации у грибов, но и так называемой нной конверсии, речь о которой пойдет несколько позже.

11.1.3. МОДЕЛЬ ЖОСТАКА (ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫЙ РАЗРЫВ-РЕПАРАЦИЯ)

В частичном противоречии с логикой классической модели находятся и результаты, полученные на дрожжах *Saccharomyces*, свидетельствующие о том, что первоначальное событие, приводящее у них к рекомбинации, – это не одноцепочечный, а двухцепочечный разрыв в одной из хромосом. Принято считать, что любое повреждение, затрагивающее две цепи (сестринские хроматиды) одной хромосомы чрезвычайно опасно, поскольку при отсутствии репарации может приводить к генетической нестабильности, хромосомным перестройкам и гибели клеток. Однако двухцепочечные разрывы ДНК постоянно возникают в процессе нормальной жизнедеятельности клеток. У дрожжей они играют ключевую роль в инициации мейотической рекомбинации.

Последовательность событий, приводящих к рекомбинации в данном случае, более сложна, чем в модели Холлидея (рис. 11.4).

1–2. Вначале частичная деградация разорванных сестринских хроматид под действием экзонуклеаз приводит к образованию выступающих 3′-концов.

3. Затем одна из цепей взаимодействует с несестринской хроматидой и замещает в ней такую же цепь, которая, в свою очередь, образует гетеродуплекс с оставшимся одноцепочечным участком. Область спаривания расширяется, дополнительный синтез восполняет утерянную информацию.

4. В результате возникает промежуточный продукт, содержащий с обеих сторон от сайта двухцепочечного разрыва по две полухиазмы Холлидея. Кроме того, в его составе есть два гетеродуплексных участка.

5. Этот промежуточный продукт разрешается на конечные продукты рекомбинации под действием резольвазы, разрезающей полухиазмы либо в паре цепей, находящихся в точке перекреста, либо в интактной паре.

Пока не ясно, как свободные одноцепочечные участки находят другие хроматиды. Однако логически такой ход событий также может быть оправдан: сходные процессы должны протекать при репа-

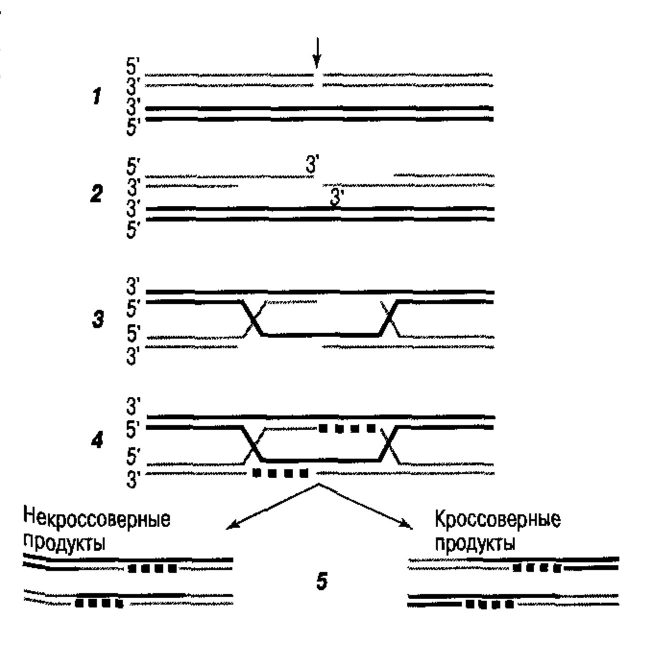


Рис. 11.4. Модель Жостака. (Из: Глазер, Глазунов, 1999)

ации двухцепочечных разрывов. Первый контакт инициациирует сближение хроматид и последующее образование синаптонемного комплекса. Основные этапы той модели получили экспериментальное подтверждение. Многими исследователями показано, что специфические двухцепочечные разрывы связаны с «горячими» точками мейотической рекомбинации. Тем не менее, отдельные аспекты остаются не полне ясными. В частности, расположение гетеродуплексных участков ДНК в промежуточном продукте на поздних стадиях репарации. Согласно описанной выше модели Дж. Жостака, они должны формироваться за счет обеих хроматид-участниц рекомбинации, но по разные стороны от сайта инициации. Однако в экспериментальном материале тетрады (группы из четырех хроматид, равные паре гомологичных хромосом) с такой конфигурацией практически отсутствовали, зато был выявлен класс тетрад, не предсказываемый канонической моделью. Объяснение этому факту предложили Джилбертсон и Ф. Сталь. Согласно их модели (рис. 11.5), такое разрешение промежуточного продукта возможно двумя способами.

Пассивное разрешение.

1. Вначале происходит расщепление одной (на схеме – правой) полухиазмы. При том остаются незакрытыми два одноцепочечные разрыва.

2. Оставшаяся нерасщепленная (левая) полухиазма перемещается путем миграции ветвей в сторону сохранившихся одноцепочечных разрывов.

3. По достижении их полухиазма пассивно разрешается. Продукты будут проявлять родительское сочетание маркеров, независимо от ориентации полухиазмы, которая первой подверглась разрешению. Один из продуктов (именно он отсутствует в канонической модели Жостака) будет содержать гетеродуплекс.

Активное разрешение.

1. Под действием топоизомеразы, удаляющей супервитки, полухиазмы начинают сближаться.

2. Это сближение достигает предельной степени (окружностью обозначена молекула топоизомеразы).

3. На заключительном этапе топоизомераза разрешает два гомолога и формирует те же, что и в случае пассивного разрешения, продукты.

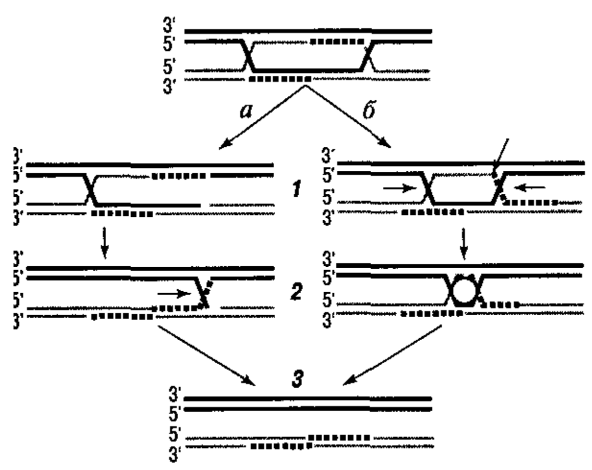


Рис. 11.5. Модель Джилбертсона-Сталя пассивное (*а*) и активное (*б*) разрешение структуры Холлидея. (Из: Глазер, Глазунов, 1999)

Идеи Джилбертсона и Сталя получили экспериментальное подтверждение. Однако следует заметить, что в сравнении с канонической моделью рекомбинационной репарации и описанный выше вариант, и другие предлагаемые системы в плане репарации, по-видимому, малоэффективны и работают только в отсут-

ствие основного механизма. Тем не менее, детальное изучение молекулярных механизмов гомологичной рекомбинации уже сейчас позволяет с полной уверенностью утверждать, что процессы генетической рекомбинации и собственно репарации двухцепочечных разрывов неразделимы. И потому термины «репарация двухцепочечных разрывов ДНК», «рекомбинационная репарация», «рекомбинация» и «генная конверсия» (она будет рассмотрена дальше) достаточно часто используются в литературе для обозначения одних и тех же процессов.

Частота рекомбинации в разных точках хромосомы может различаться, порой значительно. Как правило, этот показатель ниже в гетерохроматиновых районах, особенно – вблизи уже произошедшего обмена. Существуют «горячие» точки рекомбинации. У бактерий примером такой точки может служить *chi*-сайт последовательность из 8 нуклеотидов (5′-GCTGGTGG), регулирующая экзонуклеазную и геликазную активность гетеротримерного комплекса RecBCD. При достижении белком RecBCD *chi*-сайта производится разрез (т.е. фермент работает как экзонуклеаза), субъединица RecD высвобождается, а образовавшийся димер RecBC активно раскручивает спираль ДНК (т.е. функционирует как геликаза). По-видимому, основная функция вышеназванного фермента – создать одноцепочечный участок и свободный 3′-конец.

Другой очевидный стимул для рекомбинации – образование одноцепочечной бреши в ДНК в результате репликации на матрице с повреждением. Брешь, естественно, образуется напротив дефектного участка. В этом случае возможна рекомбинация с другой, вновь синтезированной хромосомой, не содержащей повреждения и, соответственно, бреши. Обычно для осуществления рекомбинации в подобном случае требуется дополнительный одноцепочечный разрыв в неповрежденной ДНК. Дальнейший этап рекомбинации связан с деятельностью белка RecA, который осуществляет ассимиляцию одноцепочечного участка (single-strand uptake or single-strand assimilation) – так называется процесс замещения одной из цепей ДНК в двухцепочечной молекуле одноцепочечным участком. Этот процесс происходит всегда в одном направлении – 5′ → 3′ по той цепи ДНК, комплементарная цепь которой замещается, именно поэтому нужен хотя бы один свободный 3′-конец.

Если взаимодействуют между собой две двухцепочечные молекулы ДНК (одна из которых содержит одноцепочечный участок), то вытесненная цепь, в свою очередь, образует дуплекс с ДНК из другой хромосомы, потерявшей своего партнера. Процесс вытеснения цепей продолжается с достаточно высокой скоростью – 10 20 нуклеотидов в секунду. В реализации этого важного этапа рекомбинации, участвуют продукты генов *ruvA* и *B*. Существующая структура не может быть постоянной, поскольку связывает две различные молекулы ДНК. Разрешение этой ситуации возможно с помощью разрывов ДНК. В зависимости от того, какие цепи ДНК разрываются, образуется либо рекомбинантная структура, либо не рекомбинантная, но содержащая короткие фрагменты гибридной ДНК в обеих хромосомах. Разрезание ДНК также осуществляется специальным белком, продуктом гена *ruvC*.

11.1.4. КОНВЕРСИЯ ГЕНА

Генная конверсия – это процесс нереципрокного переноса информации из одной хроматиды в другую. Очень хорошим модельным объектом для изучения этого фено-

...ла служат некоторые виды низших грибов, например, Ascomycetes, продукты мейоза которых остаются в одной крупной клетке-сумке, называемой аском (рис. 11.6, *а*), располагаясь в линейном порядке. Если мы наблюдаем за гетерозиготным штаммом (*Аа*), то следовало бы ожидать распределение аллелей в 8 спорах аска 4А:4*а*, рекомбинация может лишь поменять местами споры с разными аллелями (рис. 11.6, *б*). В 1928 г. Г. Книп обнаружил у нейроспоры отклонение от ожидаемого расщепления. Гетерозиготы *Аа* иногда давали споры в соотношении *3А* : *1а* или *1А* : *3а* и более редко – только *А* или только *а*. Такие же явления были отмечены в 1949-1953 гг. К. Линдегреном в опытах на дрожжах.

Г. Винклер, предложивший в 1930 г. назвать этот феномен конверсией, полагал, что в основе его наличие у гетерозигот наследуемых изменений (мутаций) направленного характера, при которых переход одного аллеля в другой якобы инициируется гетерозиготным состоянием локуса. Но позже было установлено, что образование аберрантных асков не связано непосредственно с возникновением мутаций. А в 1955 г. М. Митчел обнаружила связь конверсии с кроссинговером и показала, что внутригенная рекомбинация может быть нереципрокнои. Обнаружение аберрантных асков с соотношением спор 3:5 или 2:6 указывает на то, что мейотическому делению предшествовало возникновение гетеродуплексных участков кроссинговера

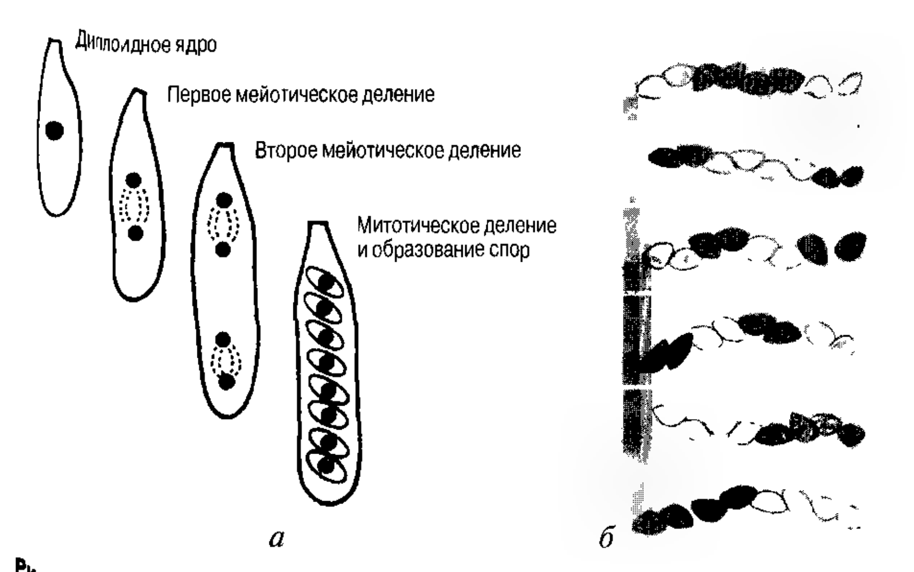


Рис. 11.6. Мейоз и митоз в жизненном цикле Ascomycetes.

а – ядро зиготы образуется при слиянии двух гаплоидных ядер В результате сразу же вслед за этим происходящих I-го и II-го деления получается четыре гаплоидных ядра, каждое из которых делится митотически, при этом ось веретена деления совпадает с продольной осью сумки (аска) Таким образом, в одном аске после окончания деления в один располагаются 8 спор, которые при помощи микроманипулятора можно выделить. (Из: Дубинин, 1986) ; б – нормальные варианты распределения аллелей в аскоспорах гетерозиготных (Аа) Ascomycetes 1 и 2 - образуются в результате расщепления при I-м делении мейоза, 3 и 4 (чередующиеся), а также 5 и 6 (симметричные) – образуются при II-м делении (Из Захаров и Квитко, 1974)

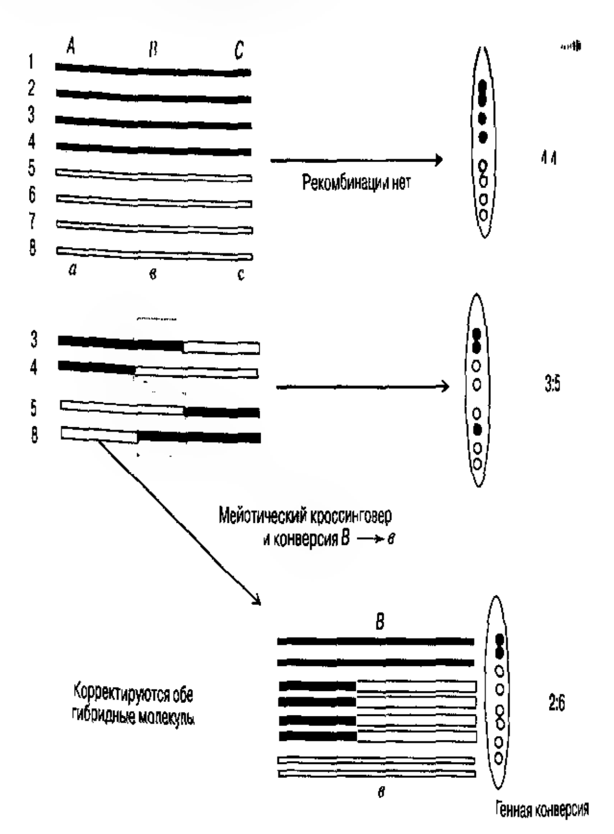


Рис. 11.7. Механизм генной конверсии. (По: Льюин, 1987)

Каждая нить - цепь ДНК (4 закрашенные - материнские, 4 не закрашенные - отцовские). Рекомбинация ведет к образованию гибридной ДНК в области, ограниченной на схеме пунктирным прямоугольником. Если коррекции подвергается одна гибридная молекула, соотношение спор в аске - 3:5. Если одинаковым способом корректируются обе гибридные молекулы, то соотношение будет 2:8.

между гомологичными материнской и отцовской хромосомами (рис. 11.7). Как выяснилось при последующем изучении, протяженность этих участков может достигать 1 т.п.н.

Когда сочлененные участки гомологичных хромосом несколько различаются, могут произойти нарушения спаривания нуклеотидов, которые не останутся «незамеченными». Они будут исправлены системой репарации, предполагающей «сверку» ДНК и изменение одного из фрагментов ДНК по матрице другого. Под влиянием такой коррекции аллель *B* «превращается» в аллель *в*. Таким образом, изменение соотношения количества спор с разными аллелями в одном аске означает, что один из аллелей перешел в альтернативное состояние.

Если первоначально конверсия гена рассматривалась только применительно к нарушению классического менделевского расщепления у Ascomycetes, то в настоящее время этот термин имеет гораздо более широкое значение: его распространили

на все процессы, включающие превращение одного аллеля в другой путем коррекции рекомбинационного гетеродуплекса. Причем установлено, что конверсия (нереципрокная гомологичная рекомбинация за счет коррекции неспаренных оснований в гетеродуплексе) происходит не только у прокариот, но и в половых, и в соматических клетках эукариот. В коррекции рекомбинационного гетеродуплекса у *E. coli* используется описанный в предыдущей главе механизм репарации с участием генов системы *MutHSLU*. Для части бактериальных белков этой системы выявлены гомологи у эукариот (*MHSLH – MutHSL homologs*, или *PMS – post meiotic segregation*). Причем, у эукариот гомологи представлены целыми семействами, но не все их члены заняты в конверсии. Так из шести гомологов *MutS* у дрожжей в конверсии участвуют четыре: *MSH1, MSH2, MSH3* и *MSH6*. У человека обнаружено 11 гомологов *MutL*, из них участие в конверсии установлено для одного (*PMS2*). Показано, что конверсия у прокариот затрагивает небольшие фрагменты ДНК (не более трех нуклеотидов). В случае постмейотической сегрегации у эукариот изменяется несколько большая часть гена: от восьми до двенадцати нуклеотидов. Конверсия может иметь место и в случае митотической рекомбинации, но значительно реже. К общим закономерностям процесса конверсии следует отнести: 1) совместное конвертирование всех гетерозиготных маркеров, попавших в гетеродуплекс; 2) случайный выбор удаляемого основания из двух неспаренных; 3) полярность – снижение частот конверсии разных аллелей одного гена, начиная с определенной точки (чаще всего от одного конца гена к другому). Полярность указывает на наличие в хромосомах фиксированных точек начала рекомбинации.

11.2. САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ

В 1962 г. А. Кэмпбелл, исследуя интеграцию генома фага λ в хромосому *E. coli*, обнаружил, что встраивание происходит в одном, строго определенном сайте бактериальной хромосомы. Это наблюдение положило начало изучению механизмов рекомбинации между молекулами ДНК с низким уровнем гомологии или с полным ее отсутствием. Различают два типа сайт-специфической рекомбинации: *двойную*, или собственно сайт-специфическую (оба рекомбинирующих дуплекса ДНК несут последовательности, специфично распознаваемые ферментами рекомбинации), и *одиночную* (такие последовательности находятся только в одном из дуплексов ДНК), называемую незаконной. Различия между сайт-специфической и незаконной рекомбинацией не четкие и связаны со степенью сходства нуклеотидных последовательностей, участвующих в данном процессе.

Обязательное условие сайт-специфической рекомбинации – наличие короткого (около 10 п.н.) участка гомологии у двух взаимодействующих молекул ДНК. Процесс обеспечения специфическими ферментами – **рекомбиназами**, распознающими области гомологии и катализирующими обмен генетическим материалом. Эти ферменты могут быть подразделены на две основные группы: **топоизомеразы** (Xer, Cre, Int/Xis) и **резольвазы** (Tn-резольвазы, инвертазы).

В результате сайт-специфической рекомбинации образуются два типа продуктов. Если рекомбинирующие участки ориентированы противоположно (АВ и ВА), то рекомбинантный сегмент окажется инвертированным. Если же сайты рекомбинации ориентированы в одном направлении (АВ и АВ), результатом обмена будет делеция вышеназванного сегмента и образование кольцевой молекулы из оставшейся ДНК. Иначе говоря, рекомбинация инвертированных повторов порождает инверсию участка гомологии, а прямых – его делецию.

Наиболее подробно она исследована при взаимодействии бактериофага λ с кольцевой хромосомой *E. coli*. При попадании фаговой частицы в бактериальную клетку события могут развиваться двояко. В первом случае ДНК фага остается в виде независимо реплицирующейся кольцевой структуры и при размножении частиц фага лизируют клетку-хозяина (*литический цикл*). Во втором случае фаговая ДНК встраивается в бактериальную хромосому и реплицируется вместе с ней, т.е. фаг переходит в неактивное состояние – *профага*. Однако это состояние нестабильное: при определенных условиях происходит индукция – профаг вырезается и вступает в литический цикл.

Переход из одного состояние в другое основан на смене процессов интеграции и вырезания (рис. 11.8). Интеграция (встраивание) происходит всегда по одним и тем же сайтам в бактерии и фаге - *att* (от англ. *attachment* – прикрепление). Этот участок гомологии у *E. coli* локализован между оперонами *gal* и *bio*, обозначается как *attB* и состоит из 30 пар нуклеотидов. Он имеет центральный элемент длиной всего 15 пар нуклеотидов, который и участвует в рекомбинации. Структура сайта рекомбинации у *E. coli* стандартно обозначается как ВОВ', где В и В' – противоположные концы бактериальной ДНК центрального элемента. Сайт рекомбинации бактериофага (*attP*) имеет центральный район того же, что и у *E. coli* размера и обозначается как РОР'. Однако фланкирующие последовательности с обеих сторон от *attP* имеют большое значение, так как содержат связующие сайты для ряда белков, необходимых при протекании рекомбинации. Плечо Р имеет длину 150 пар нуклеотидов, а Р' – 90. Таким образом бактериальный и фаговый сайты

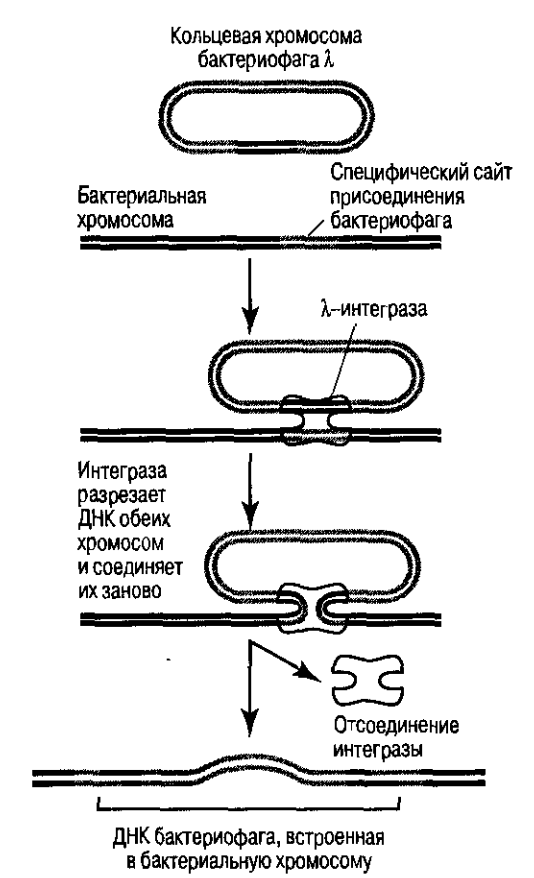


Рис. 11.8 Сайт-специфическая рекомбинация. Встраивание ДНК бактериофага λ в бактериальную хромосому. (Из: Жимулев, 2002)

имеют полную гомологию в центре (core), но различаются по краям. Полный размер последовательностей, принимающих участие в механизме обмена – ≈240 п.н. Если удалить сайт *attB* из бактериальной хромосомы, эффективность встраивания снизится в 1000 раз, причем вторичные сайты встраивания будут похожими на первичный. Интеграция осуществляется с помощью продукта фагового гена *int* и бактериального белка IHF (от англ. *integration host factor*). Белок Int (интеграза) вовлечен также в процесс вырезания. Однако основная роль здесь принадлежит эксцизазе – белковому продукту фагового гена *xis*.

Интеграза обладает топоизомеразной активностью: она формирует ковалентную связь с ДНК в тех же местах, где и разрывает ее. Интеграза делает одноцепочечный разрез в суперскрученной ДНК, благодаря чему осуществляется свободное вращение и удаление супервитков. Разрезание и воссоединение цепей, приводящее к рекомбинации, может протекать с образованием промежуточной формы, подобной структуре Холлидея с очень коротким дуплексным участком. Особенность сайт-специфической рекомбинации состоит в том, что белки, участвующие в ней, имеют сродство к определенной последовательности ДНК. В процессе встраивания генерируются всегда одинаковые, липкие концы (неинвертированные повторы), по которым и происходит встраивание. Интегрированный в результате рекомбинации профаг фланкирован двумя последовательностями: левая имеет структуру BOP′, а правая – POB′. Таким образом, механизм сайт-специфической рекомбинации значительно отличается от механизма гомологичной рекомбинации.

11.3. НЕЗАКОННАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ

Одиночная сайт-специфическая рекомбинация (незаконная) связана с мобильными генетическими элементами (МГЭ), рассмотренными в гл. 4. Напомним только, что к ним относятся IS (от англ. *insertion sequences)* элементы, или вставочные последовательности, и транспозоны – мобильные элементы, которые могут самостоятельно перемещаться из одного места генома в другое без использования промежуточной, независимой формы (такой, как плазмида). Их перемещение не связано с гомологией последовательностей. Оба типа мобильных элементов: IS-последовательности и транспозоны обнаруживаются в геноме прокариот и могут присутствовать в плазмидах.

Длина IS-элементов составляет примерно 1 000 п.н., на концах находятся короткие инвертированные повторы. IS-элемент встраивается в геном, и сайт встраивания (обычно несколько нуклеотидов, в среднем – 9) удваивается, фланкируя вставку в качестве прямого повтора. Обычно все пространство IS между повторами кодирует транспозазу – фермент, осуществляющий транспозицию. Частота транспозиции составляет 10^{-3}–10^{-4} на элемент на поколение, вырезание происходит в 100 раз реже, чем инсерция.

Существуют два механизма транспозиции:

- репликативная транспозиция – увеличивает количество транспозонов, т.к. исходный родительский транспозон остается на своем месте; нуждается в транспо-

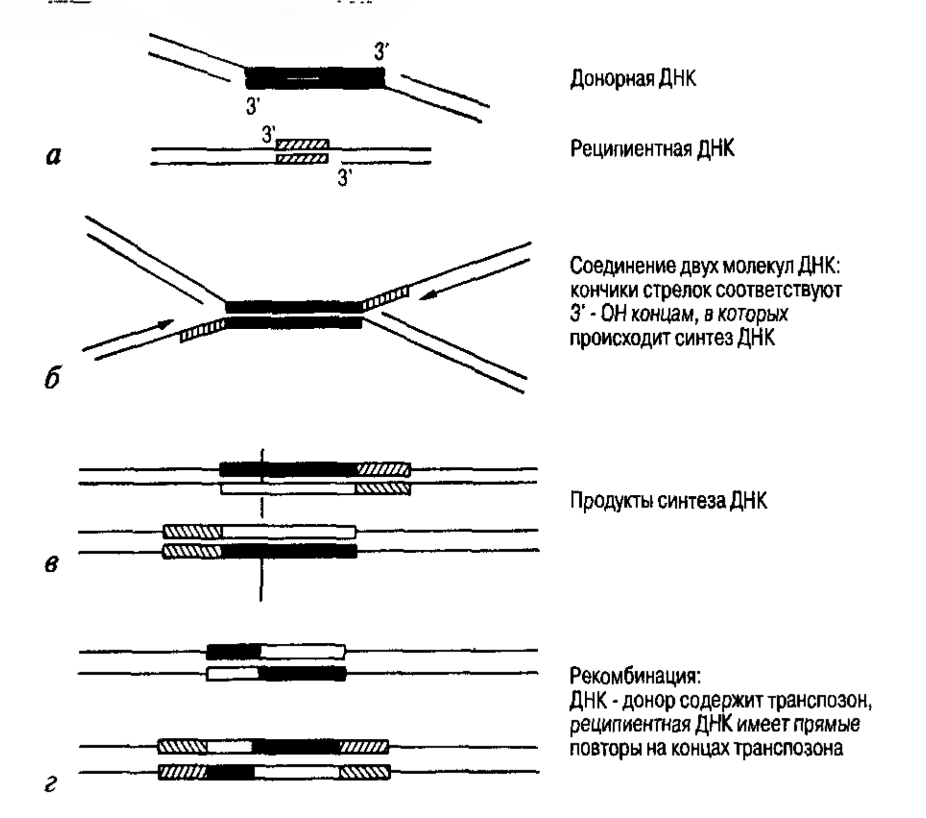


Рис. 11.9. Незаконная рекомбинация. Модель Шапиро. (Из: Фогель и Мотульски, 1990)

зазе (взаимодействует с концами родительского транспозона) и резольвазе (взаимодействует с дочерней копией);

- нерепликативная транспозиция (транспозон физически перемещается);

Согласно модели, предложенной в 1979 г. Дж. Шапиро (рис. 11.9) репликативная транспозиция осуществляется следующим образом:

а) на двух концах транспозона/IS-элемента (темные сегменты в верхней молекуле ДНК) двухцепочечная донорная ДНК разрезается рестриктазой;

б) таким же способом «открывается» с противоположного конца реципиентная ДНК. В области разрывов концы транспозона соединяются с выступающими концами разрыва реципиентной ДНК. *При этом образуются две «вилки» со свободными 3'*-ОН-группами, способными осуществлять функцию затравок репликации;

в) затем в обеих вилках начинается полуконсервативная репликация МГЭ, продолжающаяся до момента встречи двух вилок и двух копий транспозона: одной – в исходном положении, другой – встроенной в структуру реципиентной ДНК. Репликация сопровождается дуплицированием небольшого участка реципиентной ДНК, копии которого оказываются расположенными по обе стороны встроенного МГЭ;

г) после этого происходит сайт-специфическая реципрокная рекомбинация (по внутреннему сайту разрешения – IRS). В итоге ДНК-донор содержит транспозон, а

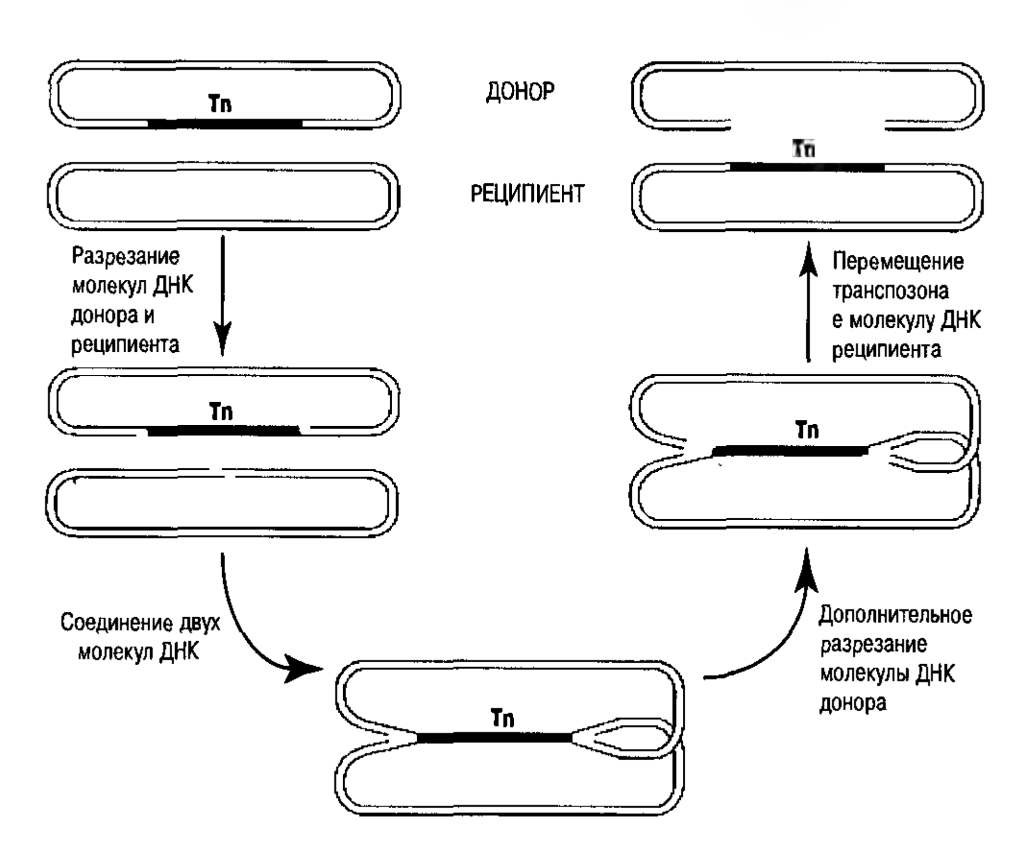


Рис. 11.10. Нерепликативная (консервативная) транспозиция (По: Brown, 2002). Дополнительное разрезание молекулы ДНК донора приводит к вырезанию транспозона и перемещению его в ДНК реципиента

ецципиентная ДНК – транспозон и фланкирующие последовательности, состоящие з прямых повторов.

Таким образом, при внедрении мобильного элемента встраивается не он сам, а го копия. Транспозиция проходит через образование коинтеграта, которое привоит к слиянию двух репликонов, содержащих по одной копии транспозона на кажом из стыков, и завершается разделением коинтеграта при участии резольвазы. тапы консервативной транспозиции представлены на рис. 11.10. Строго говоря, ранспозиция – это не тип рекомбинации, а процесс, в ходе которого сегменты ДНК ереносятся из одной хромосомы в другую с помощью рекомбинации.

11.4. ЗНАЧЕНИЕ РЕКОМБИНАЦИИ

Іожно выделить два наиболее важных процесса, где рекомбинация играет значиельную роль. Во-первых, это рекомбинационная репарация ДНК, которая особен-

но важна в тех случаях, когда возможна потеря информации за счет повреждения обеих цепей ДНК. Примером такого рода является образование одноцепочечной бреши во время репликации напротив нерепарированного повреждения. Подобная ситуация не может быть исправлена безошибочно без привлечения другой молекулы ДНК. Исследование рекомбинации у бактерий и одноклеточных эукариот позволяет предположить, что основное значение этого процесса – обеспечение репарации в тех случаях, когда повреждены обе цепи ДНК.

Во-вторых, как одна из составляющих комбинативной изменчивости, рекомбинация вносит существенный вклад в увеличение генетического разнообразия. В частности, процессы незаконной рекомбинации сопряжены с транспозицией МГЭ и вирусов, а также могут способствовать внедрению чужеродной ДНК. Кроме того, известен ряд заболеваний, возникающих у человека вследствие некорректной гомологичной рекомбинации.

В геноме человека встречаются области протяженной гомологии, особенно часто возникающие вследствие дупликации (удвоения) относительно крупных фрагментов ДНК. Один из примеров такого рода – дупликация фрагмента ДНК, содержащего гены *CYP21* и ген комплемента. В ходе эволюции одна из копий, *CYP21A*, накопила наследуемые изменения (мутации) и стала неактивной (образовался, так называемый, псевдоген). В результате высокой степени гомологии псевдогена *CYP21A* и активного *CYP21B* гена рекомбинация в гомологичных хромосомах может пойти по пути конверсии с перемещением участка гена *CYP21B* на *CYP21A*. Либо может возникнуть делеция гена *CYP21B*. Отсутствие активного гена в геноме приводит к адреногенитальному синдрому с гиперплазией коры надпочечников, вызванной недостаточностью 21-гидроксилазы.

Во многих случаях причиной недостаточности 21-гидроксилазы являются мутации, произошедшие в результате генной конверсии. Доказательством служит то, что практически все точковые мутации в этом гене соответствуют нормальной последовательности псевдогена.

Другим примером может служить дупликация гена миелинового белка *PMP22*, которая происходит в результате гомологичной рекомбинации между крупными повторами (REP), которые фланкируют область 1.5 млн.п.н., содержащую ген. Эта дупликация – наиболее частая причина невральной амиотрофии Шарко -Мари–Тус. Делеция гена миелинового белка *PMP22* приводит к менее тяжелому заболеванию – наследственной нейропатии. Более подробно эти заболевания рассмотрены в части II. **Медицинская генетика.**

ГЛАВА 12 РЕГУЛЯЦИЯ ГЕННОЙ АКТИВНОСТИ

Геном эукариот – это сложно организованная система, в которой чередуются кодирующие и некодирующие нуклеотидные последовательности ДНК. Главную функцию – передачу наследственных признаков от одного поколения к следующему выполняют кодирующие участки генов – **экзоны**. Число генов у различных видов пока еще точно не определено. У человека по последним оценкам оно равно примерно 35 000. Последовательности генов, кодирующих белки, составляют всего 3% от суммарной ДНК генома. К некодирующим последовательностям относятся **интроны**, **регуляторные участки** в 5′- и 3′-концах генов, **энхансеры** (усилители транскрипции) и **сайленсеры** (участки, ослабляющие транскрипцию). Кроме того, некодирующими являются различные варианты повторов в сателлитной ДНК, расположенные в прицентромерных и теломерных районах хромосом. Согласованное действие всех перечисленных элементов генома, определение времени активации/репрессии генов на разных этапах онтогенеза, участие регуляторных последовательностей в определении активности не только конкретного гена, но и других генов – все это предполагает сложную систему регуляции экспрессии генетического материала.

Существуют различные варианты контроля генной активности. Так, постоянным уровнем экспрессии генов обеспечивается конститутивный синтез белка у прокариот и эукариот. В случае другого – индуцибельного варианта, белок синтезируется по мере необходимости за счет механизма индукции/репрессии транскрипции соответствующих генов. Для осуществления регуляторных функций в клетке используются специальные регуляторные белки, кодируемые генами, которые также называются регуляторными.

12.1. РЕГУЛЯЦИЯ ГЕННОЙ АКТИВНОСТИ НА УРОВНЕ ТРАНСКРИПЦИИ

Транскрипция – передача генетической информации с ДНК на РНК – достаточно подробно описана в различных учебниках биохимии. Остановимся только на основных особенностях этого процесса, осуществляемого с помощью ферментов и белковых факторов.

Ферменты и белковые факторы транскрипции. Ключевой фермент транскрипции – РНК-полимераза. У прокариот она состоит из пяти субъединиц, одна из которых

(σ-субъединица) предназначена для инициации транскрипции, а другие – для ее элонгации. У эукариот обнаружено три РНК-полимеразы, их локализация в клетке и функции различны. РНК-полимераза I выявляется в ядрышке и ответственна за транскрипцию рРНК, РНК-полимераза II находится в нуклеоплазме и обеспечивает 20–40% клеточной активности. Она ответственна за синтез гетерогенной ядерной РНК (гяРНК) – предшественника мРНК. РНК-полимераза III локализована в нуклеоплазме и осуществляет синтез малых ядерных РНК, тРНК и 5SРНК. Однако многие малые РНК транскрибируются РНК-полимеразой II. За раскручивание ДНК на участке, подлежащим транскрибированию, а также спирализацию ДНК после окончания синтеза РНК и отсоединение транскрипта от ДНК отвечают ДНК-топоизомеразы. В процессе аутосплайсинга задействованы рибозимы РНК с ферментоподобной активностью.

У бактерий РНК-полимераза связывается непосредственно с промотором, а у эукариот для этого необходимо присутствие дополнительных белков. Белки, которые помогают РНК-полимеразе узнать промотор, называют факторами транскрипции (TF – от англ. *transcription factor*). В отличие от σ-фактора они могут присоединяться к ДНК независимо. Например, белок TBP связывается с TATA-боксом промотора, NF-EI-эритроид-специфический фактор; TF-II-факторы образуют базальный транскрипционный комплекс с РНК-полимеразой II, TF-III – с РНК-полимеразой III.

12.1.1. ЭТАПЫ ТРАНСКРИПЦИИ

Транскрипция, как и другие процессы синтеза биополимеров, состоит из следующих этапов: инициации, элонгации и терминации. **Инициация** важнейший этап, во время которого осуществляется регуляция процесса транскрипции.

РНК-полимераза прокариот выбирает матричную цепь, находит промоторный участок (структура его описана ниже) и локально расплетает цепи ДНК. После образования гибридного ДНК/РНК-олигонуклеотида одна из субъединиц, называемая сигмой, отделяется от РНК-полимеразы. Следующий этап – **элонгация**, как и все матричные процессы, проходит в направлении 5'→ 3'. Синтезируемая вновь молекула РНК комплементарна матричной цепи. РНК-полимераза осуществляет элонгацию цепи РНК путем присоединения рибонуклеозидмонофосфатов из рибонуклеозидтрифосфатов: ATP, GTP, UTP, CTP.

У бактерий частично синтезированная молекула РНК соединяется с рибосомами, и еще до окончания процесса транскрипции с 5'-конца начинается трансляция. На 3'-конце находятся терминаторные последовательности ДНК, ответственные за прекращение транскрипции. У прокариот существует **два типа терминации**: ρ-зависимая, требующая участия ρ-факторов, и ρ-независимая. После окончания транскрипции, как у прокариот, так и у эукариот происходит цепь биохимических реакций, которая приводит к созреванию молекул предшественников: транспортной РНК (пре-тРНК) и рибосомной РНК (пре-рРНК) и пре-мРНК (только у эукариот). Совокупность реакций, приводящая к формированию зрелой (готовой к трансляции) молекулы мРНК, называется процессингом.

Особенности транскрипции у эукариот. Процессинг мРНК. Процессинг включает следующие преобразования молекулы мРНК: 1) метилирование и кэпирование; 2) полиаденилирование; 3) сплайсинг.

Эукариотические мРНК несут, как правило, на 5′-конце дополнительную группу: КЭП-модифицированный в 7-положении метилированный остаток гуанозин-5′-трифосфата, соединенный с концевым нуклеозидом 5′ 5′-способом. Кэпирование РНК осуществляется ферментами: гуанилтрансферазой и метилтрансферазой. Предполагают, что КЭП необходим для регуляции трансляции и для стабилизации мРНК, (он предохраняет ее от действия 5′-экзонуклеаз). К 3′-концу РНК после завершения ее синтеза с помощью фермента поли(А)-полимеразы присоединяется последовательность полиадениловой кислоты. Этот процесс называют **полиаденилированием**. Остальные варианты преобразования пре-мРНК: вырезание интронов и сшивание экзонов (сплайсинг) в эукариотических генах, а также образование различных сочетаний экзонов, входящих в зрелую мРНК (альтернативный сплайсинг) – описаны в гл. 3 и 4.

Эукариотические мРНК в отличие от прокариотических стабильны в течение часов и суток. Это объясняется, во-первых, стабилизацией 5′- и 3′-концов, а во-вторых, связыванием мРНК с белками (т.е. образованием *информосом*). Пре-мРНК на всех стадиях процессинга и после него связана с белками. Информосомы могут быть ядерными и цитоплазматическими. Ядерные информосомы – это рибонуклеопротеиновые (РНП) частицы с константой седиментации 30S. Посттранскрипционный внутриядерный перенос пре-мРНК из ядра в цитоплазму осуществляется с помощью ядерных информосом. При этом переносе зрелой мРНК происходит замена связанных с мРНК белков. Ядерные информоферы (белковые глобулы) остаются в ядре, а мРНК после перехода в цитоплазму объединяется с новыми белками, образуя цитоплазматические информосомы. Цитоплазматические информосомы не обязательно транслируются, т.е. могут быть свободными.

12.1.2. РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ У ПРОКАРИОТ

Единицей транскрипции у прокариот могут быть отдельные гены, но чаще они организованы в структуры, называемые **оперонами**. В состав оперона входят расположенные друг за другом структурные гены, продукты которых обычно участвуют в одном и том же метаболическом пути. Как правило, оперон имеет один набор регуляторных элементов (регуляторный ген, промотор, оператор), что обеспечивает координацию процессов транскрипции генов и синтеза соответствующих белков. **Промотор** – это участок ДНК, ответственный за связывание с РНК-полимеразой. В случае прокариот, наиболее важными для регуляции транскрипции являются последовательности, обозначаемые «–35» и «– 10». Нуклеотиды, расположенные до инициирующего кодона («вверх по течению») записываются со знаком «–», а со знаком «+» – все нуклеотиды, начиная с первого в инициирующем кодоне (стартовая точка). Направление, в котором продвигается процесс транскрипции, называется «вниз по течению». Последовательность, обозначаемая «–35» (TTGACA), отвечает за узнавание промотора РНК-полимеразой, а последовательность «–10» (или бокс Приб-

нова) является тем участком, с которого начинается раскручивание двойной спирали ДНК. В состав этого бокса наиболее часто входят основания ТАТААТ. Такая последовательность оснований чаще всего встречается в промоторах прокариот, ее называют *консенсусной*. В состав ТАТА-бокса входят аденин и тимин, между которыми имеются только две водородные связи, что облегчает расплетание цепей ДНК в этом районе промотора. В случае замен пар оснований в указанных последовательностях промотора нарушается эффективность и правильное определение точки начала транскрипции, с которой фермент РНК-полимераза начинает синтез РНК. У прокариот наряду с промотором имеются и другие регуляторные участки: это *активатор* и ***оператор.***

Оператор – участок ДНК, с которым связывается белок-репрессор, мешая РНК-полимеразе начать транскрипцию. В лактозном опероне левая часть промотора (активатор), связывается с белком-активатором катаболизма (БАК, или САР в английской терминологии, *catabolite activator protein*), а правая часть – с РНК-полимеразой. БАК-белок в отличие от белка-репрессора играет позитивную роль, помогая РНК-полимеразе начать транскрипцию. Возможны различные варианты взаимодействия регуляторных участков с ферментами и регуляторными белками, а последних – с молекулами, называемыми индукторами (эффекторами).

12.1.3. НЕГАТИВНАЯ И ПОЗИТИВНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ГЕННОЙ АКТИВНОСТИ

В зависимости от характера взаимодействия оператора и регуляторного белка у прокариот различают два типа регуляции активности генов в опероне: негативную и позитивную (рис. 12.1). При *негативной*, или отрицательной, регуляции связывание регуляторного белка с оператором репрессирует работу оперона, а при *позитивной* – наоборот, активирует его . В свою очередь негативной и позитивной могут быть как индукция, так и репрессия. В случае негативной индукции индуктор делает регуляторный белок неспособным связываться с оператором, и при этом структурные гены транскрибируются как, например, в лактозном опероне. При негативной же репрессии регуляторный белок приобретает свойства репрессора после взаимодействия с корепрессором. Таким корепрессором в триптофановом опероне служит накопленный в клетке триптофан, взаимодействие его с регуляторным белком приводит к подавлению транскрипции. При *позитивной*, или положительной, индукции под влиянием индуктора регуляторный белок (апоиндуктор) связывается с оператором и помогает РНК-полимеразе начать транскрипцию. В случае же позитивной репрессии корепрессор инактивирует апоиндуктор и тем самым способствует прекращению транскрипции.

Поскольку при транскрипции оперона, состоящего из нескольких структурных генов, образуется один общий транскрипт в виде молекулы полицистронной мРНК, все эти гены экспрессируются координированно.

Лактозный оперон. Наиболее хорошо изученный способ регуляции транскрипции у бактерий – негативная регуляция с использованием белков-репрессоров, которая обычно рассматривается на примере lac-оперона (рис. 12.2). Протяженность лактозного оперона вместе с регуляторным геном составляет 6000 п.н. Между регулятор-

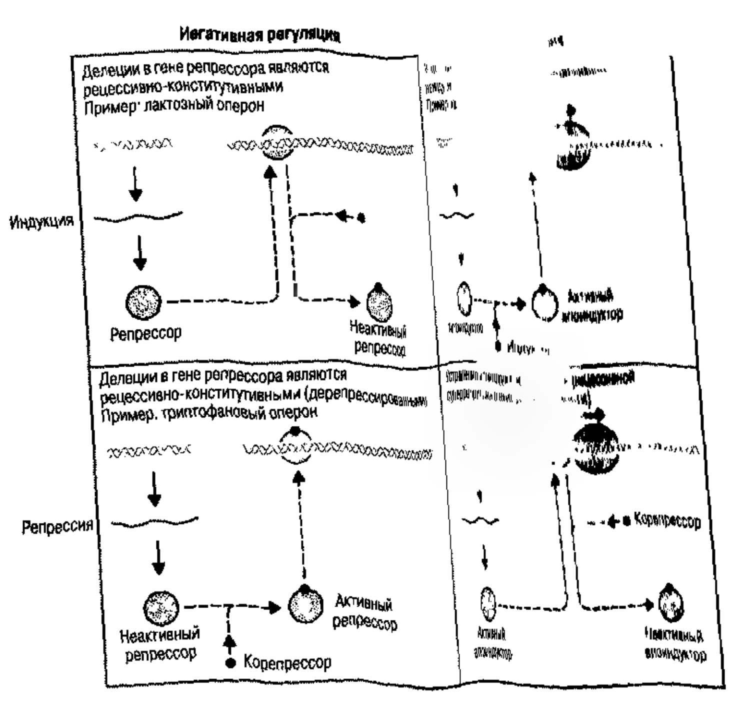


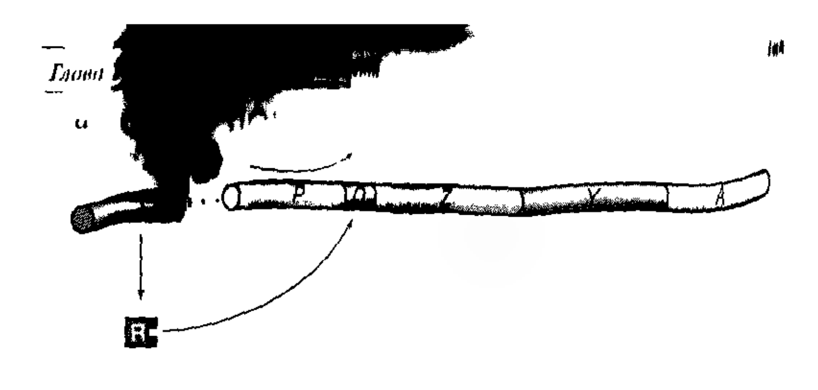
Рис. 12.1. Регуляция активности генов у прокариот (По Льюин, 1987)

ным геном *lac I* и первым структурным геном *lac Z* расположены контролирующие элементы, каждый из которых состоит из нескольких десятков пар нуклеотидов. Промотор состоит из 85 п.н., оператор – из 26 п.н. Левая часть промотора связывается с белком-активатором (БАК, или CAP), а правая часть с РНК-полимеразой. Все три гена *Z, Y, A* транскрибируются на одну полицистронную мРНК, с которой последовательно транслируются соответствующие белки (β-галактозидаза, β-галактозид-пермеаза и трансацетилаза). Регуляторный ген *lacI*, расположенный на некотором расстоянии от регуляторной части оперона, имеет свой промотор и терминатор. Белок, транслируемый с мРНК этого гена, называется репрессором, поскольку он, присоединяясь к оператору, преграждает путь РНК-полимеразе к структурным генам, препятствуя транскрипции.

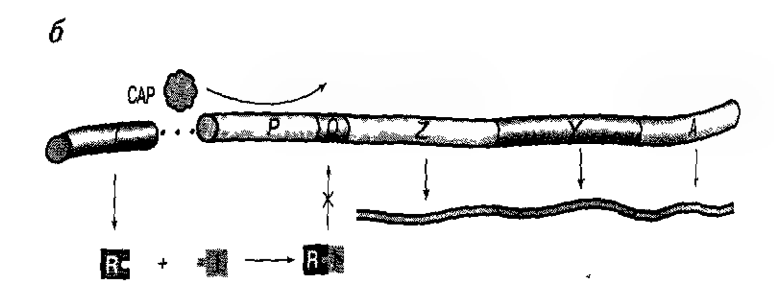
Если единственным источником энергии служит лактоза, репрессор инактивируется в результате присоединения к нему ее молекул. При этом промотор остается открытым для продвижения РНК-полимеразы и инициации транскрипции структурных генов оперона. Мутации в гене белка-репрессора приводят к конститутивному синтезу белков лактозного оперона, поскольку при этом репрессор «не мешает» РНК-полимеразе транскрибировать структурные гены.

Рассмотренный механизм регуляции lac-оперона показывает, каким образом активируется синтез белков лактозного оперона при появлении в среде лактозы. Однако активации не происходит, если поставщиком углерода и энергии в среде служит только глюкоза. Существует механизм репрессии лактозного оперона, основанный на использовании белка-активатора CAP. Этот белок играет роль регулятора для не-

а



б



в

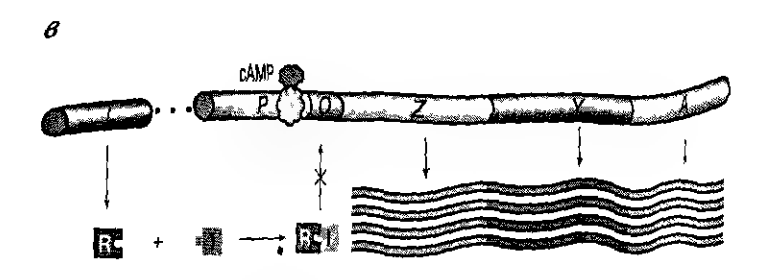


Рис. 12.2. Лактозный оперон (Из: Griffiths, 2000)

а – в среде есть глюкоза, нет лактозы, lac-мРНК не образуется; б – в среде снижен уровень глюкозы, есть лактоза, уровень cAMP низкий; в – уровень cAMP высокий, структурные гены Z, Y, A транскрибируются с образованием достаточного количества полицистронной мРНК. CAP – белок активатор, P – промотор, R – репрессор, I – индуктор (лактоза

скольких генетических систем, ответственных за использование лактозы, галактозы и арабинозы, как альтернативных источников энергии и углерода. Белок-активатор существенно увеличивает сродство РНК-полимеразы к соответствующим промоторам после присоединения к нему молекулы cAMP (циклического аденозинмонофосфата). В присутствии глюкозы уровень cAMP остается низким, и активации оперонов, ответственных за использование лактозы, галактозы и арабинозы, не происходит. Уровень cAMP в клетке возрастает при исчезновении глюкозы (сигнал «голода»), и белок CAP вместе с молекулой cAMP присоединяется к ДНК в районе промоторов трех оперонов, создавая одно из необходимых условий для начала транскрипции.

12.2. РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЭУКАРИОТ

Регуляцию активности у эукариот можно подразделить на специфическую и неспецифическую. Специфическая регуляция проявляется в активации или инактивации транскрипции с отдельных генов с участием промоторов, энхансеров, сайленсеров.

12.2.1. СПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ГЕННОЙ АКТИВНОСТИ

Промоторы. Регуляция экспрессии генов эукариот основана на тех же принципах, что и у прокариот, хотя существуют и различия. Во-первых, как уже упоминалось, у эукариот нет оперонов, и каждый ген представляет собой независимую транскрипционную единицу. Промоторы эукариот несколько отличаются от прокариотических по структуре. Функционально наиболее важные последовательности в промоторе эукариотического гена находятся в положениях «–25» (бокс Хогнесса) и «–75». Есть и другие участки, более удаленные от стартовой точки транскрипции (рис. 12.3).

Другую структуру имеют промоторы генов транспортных, рибосомных РНК и 5SРНК. Прежде всего, эти промоторы внутренние, поэтому перед номерами их нуклеотидов ставится знак «+». Промотор гена тРНК представлен на рис. 12.4. В промоторе гена тРНК имеются А- и В-боксы. Установлены их канонические последовательности. При уменьшении расстояния между боксами транскрипция снижается или полностью прекращается. Замена всего одного нуклеотида в В-боксе в положении 56 CG → GC в TχG петле искажает правильную структуру тРНК. Регуляторная область гена 5S имеет сходную структуру. Она расположена между +50- и + 90-нуклеотидами и также имеет А- и С-боксы (рис. 12.5).

Энхансеры. Среди регуляторных элементов эукариот выделяют энхансеры, которые обычно располагаются достаточно далеко от регулируемого гена. Предполагается, что сближение энхансера и промотора достигается в результате образования между ними петли ДНК, при этом белки-активаторы, «узнающие» энхансер, могут непосредственно взаимодействовать с транскрипционным комплексом.

Энхансеры – усилители транскрипции – обладают следующими свойствами:

- могут находиться как в 5', так и в 3'-областях, а также в интронах и даже на значительном расстоянии от промоторов;
- активируют гены независимо от ориентации;
- один энхансер может активировать различные гены;
- действие их может быть ткане- и видоспецифичным;
- энхансеры доступны действию различных белков, в том числе и гормонов.

Рис. 12.3. Структура промотора эукариотического гена.

Функционально наиболее важные участки расположены в положениях «-25» (бокс Хогнесса) и «-75»

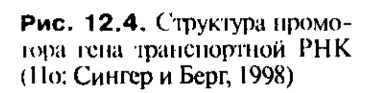
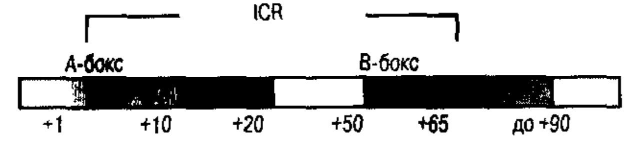



Рис. 12.4. Структура промотора гена транспортной РНК (По: Сингер и Берг, 1998)

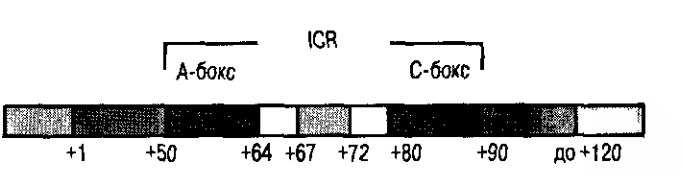


Рис. 12.5. Промотор гена 5S-рРНК (По: Сингер и Берг, 1998)

Сайленсеры – ослабители транскрипции – являются негативными элементами по отношению к транскрипции. Они так же, как и энхансеры, *функционируют в цис*-положении и могут оказывать свое действие на большом расстоянии от гена и при разной ориентации по отношению к нему.

Транскрипционные факторы. Многоклеточные эукариоты состоят из различных типов клеток, разнообразие которых обусловлено дифференциальной экспрессией генов, определяющих образование тканеспецифических белков. Один из механизмов, лежащих в основе дифференциальной экспрессии, – регуляция процесса транскрипции.

Так, изучено влияние регуляторных белков на активность промотора альбуминового гена *ALB* млекопитающих, функционирующего в клетках печени. Левее стартовой точки расположены: последовательность промотора ТАТА (определяющего начало транскрипции, но не частоту инициации этого процесса) и последовательность ССААТ (влияющая на эффективность транскрипции). Тканевая специфичность определяется взаимодействием специфических факторов транскрипции со вспомогательными последовательностями промотора РЕ, DEI, DEII, и DEIII (рис. 12.6). Последовательность РЕ у мыши (из 13 нуклеотидов) служит сайтом связывания для тканеспецифического белка печени – HNFI. С последовательностью DEI взаимодействует белок CBP, а с DEII – NFI. Эти белки не обладают специфичностью, их роль – активация процесса транскрипции. Пока не ясно, каким образом взаимодействуют специфические и неспецифические белки в регуляторной области гена *ALB*.

Установлены сайты связывания регуляторных белков в промоторе гена β-интерферона IFN. Промотор этого гена находится между парами оснований –204 и +1. Левее ТАТА-бокса расположены последовательности пяти элементов, две из которых (NRDI и NRD2) ответственны за негативную регуляцию, а три (PRDI, PRDII и PRDIII) способствуют активации транскрипции при присоединении к ним соответствующих белков. Механизм смены этих процессов пока не изучен.

Факторы транскрипции и ядерный матрикс. Ядерный матрикс был открыт в 50-е годы прошлого века И.Б. Збарским. Эта структура состоит из нерастворимых белков. Именно на нем происходит процесс транскрипции и созревания пре-мРНК. Показано, что факторы транскрипции, соединяясь с ядерным матриксом, обеспечивают правильное пространственное расположение промоторных и энхансерных участков генов (рис 12.7). Они взаимодействуют с ДНК в участках связывания с матриксом и

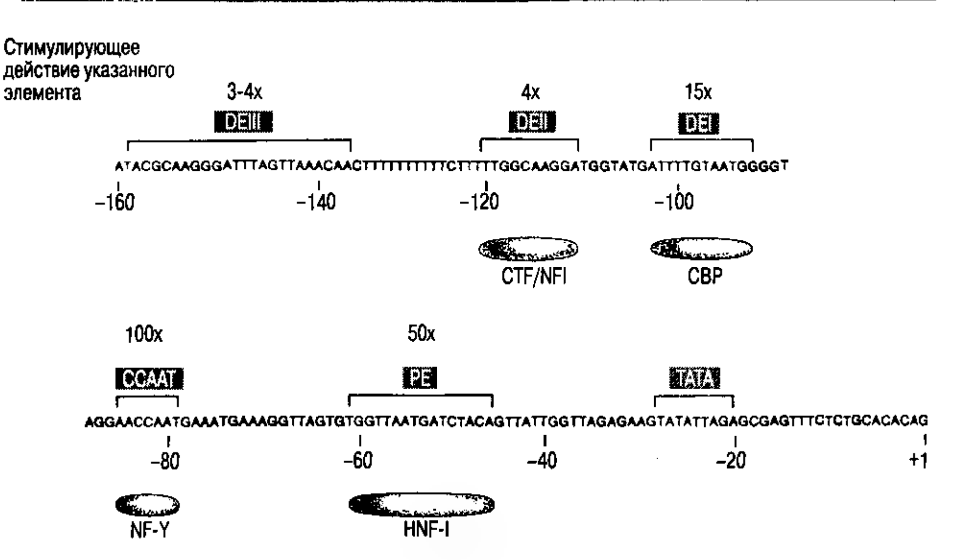


Рис. 12.6. Взаимодействие специфических факторов транскрипции со вспомогательными последовательностями промотора альбуминового гена *ALB*· PE, DEI, DEII, и DEIII. (По: Сингер и Берг, 1998)

Последовательность PE служит сайтом связывания для белка HNF1, присутствующего только в клетках печени. Белки NF-Y, CTF/NF1 и CBP участвуют в активации различных клеточных и вирусных промоторов

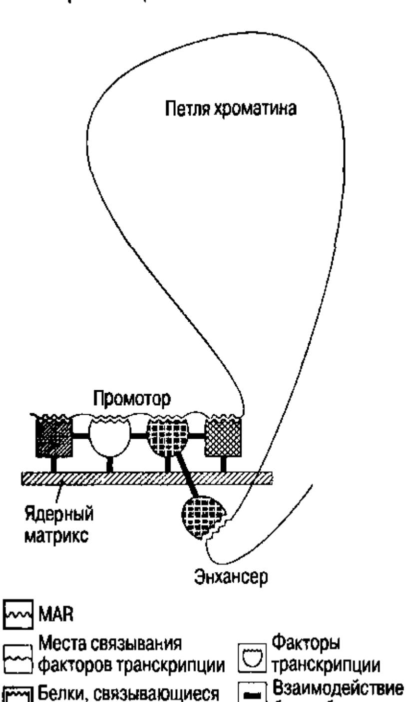


Рис. 12.7. Схема взаимодействия связанных с ядерным матриксом факторов транскрипции с петлей ДНК и белками ядерного матрикса. (Из: Н. Съяксте, Т. Съяксте, 2001)

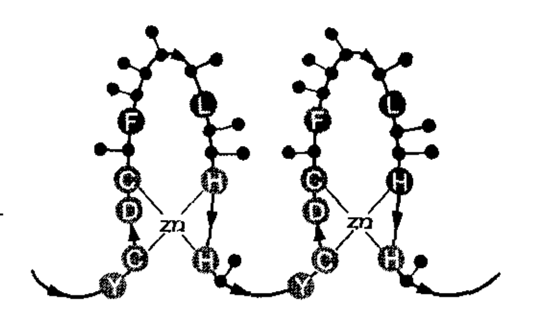


Рис. 12.8. Транскрипционные регуляторные факторы

другими белками ядерного матрикса, которых выявлено не менее 50. К ним относятся белки, связывающиеся с ДНК посредством «цинковых пальцев» (SP-1, MyTI, ZNF74, ATRX); белки, связывающиеся с ДНК с помощью «лейциновой застежки-молнии» (C/EBP, ATF, YY-1); рецепторы стероидных гормонов и ассоциированные с ними факторы; белки с HMG-доменом (HMG1, HMG2, HMG14, HMG17, AVL-1B, NMP2) и многие другие.

Часто транскрипционные регуляторные факторы имеют специфическую структуру, например, структуру типа «цинковых пальцев». Она характеризуется аминокислотными петлями, имеющими в основании два цистеина в одной части петли и два гистидина – в другой, связанные ионом цинка (рис. 12.8). Наряду с такими ферментами как РНК-полимеразы и топоизомеразы, в клетках эукариот присутствуют различные регуляторные белки, взаимодействующие с промоторами, энхансерами и сайленсерами. Таким белком является P1, взаимодействующий с CCGCCC-блоком и ядерный фактор, связывающийся с CAAT-блоком. Нуклеосомы в активном хроматине соединены с белками HMG14 и HMG17.

В научной литературе обсуждаются различные гипотезы, обьясняющие, как РНК-полимераза может транскрибировать хроматин. В соответствии с одной из них, нуклеосома разворачивается, половинки ее сердцевины разъединяются, РНК-полимераза транскрибирует ДНК, а затем половинки нуклеосомы опять складываются. Согласно другой модели, РНК-полимераза транскрибирует витки ДНК, которые нуклеосома сбрасывает по очереди: сначала один виток, а затем – другой.

Метилирование оснований ДНК. Значительную роль в регуляции экспрессии генов у эукариот может играть метилирование ДНК (обычно по 5-му углероду цитозина). Неактивные гены содержат относительно много метильных групп. Состояние повышенного метилирования может стабильно поддерживаться в течение многих поколений клеток. Для этого существует специальный механизм, обеспечивающий присоединение метильных групп в местах, аналогичных тем, где уже произошло метилирование в другой цепи. Механизм действия метильных групп заключается в том, что они нарушают взаимодействия ДНК–белок. Выступая в большую бороздку ДНК, метильные группы препятствуют связыванию транскрипционных факторов. Кроме того, метилированные районы ДНК могут взаимодействовать с транскрипционными репрессорами типа MeCP2, являющегося составной частью белкового регуляторного комплекса.

Импринтинг. Феномен импринтинга демонстрирует роль метилирования в регуляции экспрессии генов. Суть этого феномена заключается в том, что аллели, унаследованные от отца и матери, экспрессируются по-разному. Согласно одной из гипотез, это связано с различным метилированием аллелей при образовании половых клеток. Подробно болезни импринтинга рассмотрены в части II. **Медицинская генетика.**

Другой пример влияния метилирования на активность генов – **лайонизация** одной из Х-хромосом у женщин. Гены инактивированной (лайонизированной) хромосомы почти все метилированы.

12.2.2. НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ГЕННОЙ АКТИВНОСТИ

Этот тип регуляции может проявиться на разных уровнях организации генетического материала (генном, хромосомном, геномном).

Примером неспецифической регуляции на генном уровне может служить потеря активности любого гена, попавшего в гетерохроматин, при этом наблюдается так называемый «эффект положения генов». Так, у гетерозиготных самок w^+/w проявляется аллель *white* из-за потери активности нормального аллеля вследствие переноса его в прицентромерный гетерохроматин с помощью инверсии (см. рис. 5.3).

Примером регуляции активности генов на хромосомном уровне является потеря активности генов в половом хроматине, т.е. в гетерохроматизированных половых хромосомах. Факультативная гетерохроматизация достигается в этих хромосомах за счет плотной упаковки хроматина. Вследствие такой конденсации гены, локализованные в этих половых хромосомах, не транскрибируются.

В ходе развития может быть инактивирован и весь геном. У диплоидных самцов мучнистого червеца *Planococcus cirti* теряют активность все «отцовские» хромосомы, которые также, как и половые хромосомы у млекопитающих, способны к факультативной гетерохроматизации. Самцы этого вида имеют эухроматиновый материнский набор хромосом и гетерохроматиновый гаплоидный набор, полученный от отца, в то время как у самок активны оба набора хромосом, поэтому самцы мучнистого червеца, несмотря на наличие диплоидного набора хромосом, функционально гаплоидны.

Гетерохроматизироваться могут все хромосомы диплоидного организма (например, в эритроцитах у кур).

12.3. КОМПЕНСАЦИЯ ДОЗЫ ГЕНОВ

У многих видов Х- и Y-хромосомы резко различны по величине и по набору генов. В связи с этим дозы генов, локализованных в Х-хромосоме, у особей разных полов различны. Существуют механизмы компенсации доз этих генов.

12.3.1. КОМПЕНСАЦИЯ ДОЗЫ ГЕНОВ У ДРОЗОФИЛЫ

У дрозофилы единственная Х-хромосома самца направляет синтез такого же количества генных продуктов, как и обе функционально активные Х-хромосомы самки. На цитологических препаратах политенных хромосом она выглядит значительно более рыхлой, чем Х-хромосомы самки или аутосомы. Повышенная разрыхленность структуры хромосом, как известно, тесно коррелирует с более высоким уровнем транскрипции. Кроме того,в Х-хромосоме самца обнаружено повышенное содержание негистоновых (регуляторных) белков, составляющее порядка 80% от такового в двух Х-хромосомах самки.

Оказалось, что с Х-хромосомами самцов ассоциированы специфические MSL-белки (продукты генов *msl-1*, *msl-2*, *msl-3* и *mle*), которые в виде комплекса с белком MOF связываются со множеством участков Х-хромосомы и тем самым обеспечивают ее декомпактизацию. Кроме MSL-белков, важная роль в процессе декомпактизации Х-хромосомы принадлежит специфически модифицированным гистонам H4Ac16. Структурно они отличаются от обычных гистонов H4 наличием ацетильного остатка у лизина в 16-м положении молекулы H4. Полный набор MSL-белков ассоциируется с Х-хромосомой самца, происходит ацетилирование лизина в молекулах гистонов H4 и, как следствие, повышается уровень декомпактизации этой хромосомы и активность ее транскрипции (рис. 12.9, *вверху*).

Процесс дозовой компенсации так же, как и детерминация пола, у дрозофилы контролируется геном *Sxl*, продукт которого, по-видимому, взаимодействует в пер-

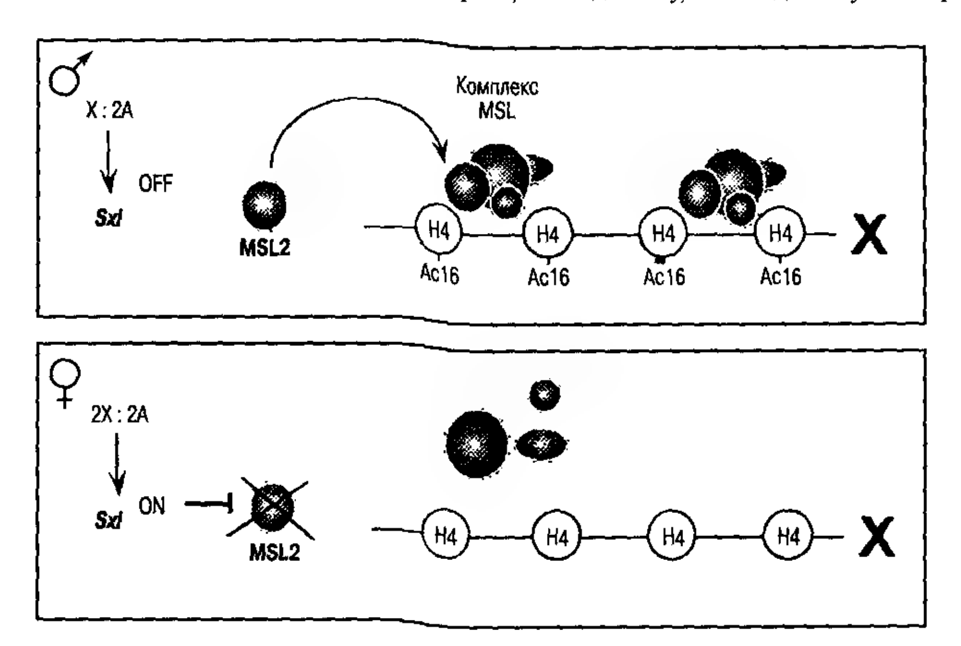


Рис. 12.9. Взаимодействие компонентов процесса дозовой компенсации у дрозофилы. (Из: Bopp, 2000)

вую очередь с геном *msl-2*: в отсутствие продукта гена *Sxl* происходит экспрессия гена *msl-2*.

«Включающий» формирование пола по женскому типу ген *Sxl* подавляет в X-хромосомах транскрипцию мРНК гена *msl-2*. В результате белок MSL2 не синтезируется, из-за чего не образуется полноценный комплекс MSL-белков и MOF-белка. Вследствие этого модификация гистонов H4, необходимая для дополнительной декомпактизации ДНК, не происходит (рис. 12.9, *внизу*).

12.3.2. КОМПЕНСАЦИЯ ДОЗЫ ГЕНОВ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Еще в 1949 г. М. Барр и Ч. Бертрам обнаружили в соматических клетках кошек-самок компактные глыбки хроматина, которые по имени одного из исследователей получили в дальнейшем название телец Барра. В 1961 г. М. Лайон, изучая действие генов X-хромосомы у мышей *Mus musculus*, выдвинула гипотезу об отсутствии генетической активности у гетеропикнотических X-хромосом, которые в различных соматических клетках мышей могут быть либо материнского, либо отцовского происхождения.

Согласно этой гипотезе, в случае гетерозиготности по генам, сцепленным с полом, самки должны иметь мозаичный фенотип, поскольку содержат два типа клеток: одни – с мутантным, другие – с нормальным геном. Правильность этого предположения для X-хромосом других млекопитающих, и в частности, человека была блестяще продемонстрирована на целом ряде примеров практически сразу после выдвижения гипотезы . Так в эритроцитах женщин, гетерозиготных по гену недостаточности глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы было обнаружено два типа клеток – с активным и неактивным ферментом. Подобный мозаичный фенотип был установлен по гену «недержания пигмента», по гену дефектной зубной эмали, а также по многим другим генам, локализованным в X-хромосоме и отвечающим за X-сцепленные наследственные заболевания. Многочисленые цитологические и биохимические исследования последующих лет подтвердили гипотезу М. Лайон и расширили описание феноменологии процесса, получившего название *лайонизации* X-хромосомы самок. Эффект лайонизации был продемонстрирован с помощью разных методов. В частности, при цветовой слепоте обнаружили пятна дефектного цветовосприятия, используя для освещения сетчатки узкий пучок попеременно то красного, то зеленого света.

Современная теория инактивации X-хромосомы. Инактивация одной из родительских X-хромосом происходит в раннем эмбриональном развитии во всех соматических клетках самок млекопитающих. Она осуществляется путем гетерохроматизации: инактивированные X-хромосомы, превращаются в плотно конденсированные тельца и в таком виде располагаются обычно по периферии ядра. Они образуют в соматических клетках гетеропикнотичные тельца Барра (половой хроматин). Ферменты транскрипции не могут работать на конденсированном хроматине, следовательно, дозы функционирующих генов становятся одинаковыми как у самцов, так и у самок. В случае полисомии по X-хромосоме инактивируются все, кроме одной хромосомы, поэтому число телец Барра можно вычислить по формуле $n-1$, где n число X-хромосом (рис. 12.10).

Рис. 12.10 Половой хроматин (тельца Барра) в эпителиальных клетках слизистой щек у человека (По: Miller, 1964)

а – отсутствие полового хроматина (кариотип 46, XY); б – одно тельце Барра (кариотип 46, XX); *в* – 2 тельца Барра (кариотип 47, XXX или 47, XXY); *г* – 3 тельца Барра (кариотип 48, XXXX или 48, XXXY); *д* – 4 тельца Барра (кариотип 49, XXXXX)

Неактивное состояние одной из Х-хромосом, установившись однажды в раннем эмбриогенезе, клонально передается дочерним соматическим клеткам во всех последующих клеточных поколениях. Предполагают, что роль механизма, закрепляющего инактивацию, играет метилирование цитозинов в молекуле ДНК.

Инактивация в соматических клетках носит, как правило, случайный, характер, т.е. равновероятный для Х-хромосом материнского и отцовского происхождения. Однако есть немногочисленные примеры неслучайной инактивации одной из родительских Х-хромосом. В первую очередь к ним относятся аллели локуса *Xce* у мышей возможного кандидата на роль центра инактивации Х-хромосомы у этих млекопитающих. Преимущественная инактивация отцовской хромосомы выявлена в соматических тканях представителей отрядов яйцекладущих и сумчатых. В оогониях самок млекопитающих незадолго до вступления в профазу I мейоза неактивная Х-хромосома подвергается реактивации, что свидетельствует об обратимом характере инактивации в клетках этого типа. У самцов мыши единственная Х-хромосома в раннем сперматогенезе инактивирована и реактивируется на его конечных этапах. Цикл инвктивации-реактивации Х-хромосомы у мыши представлен на рис. 12.11. Он демонстрирует установленную экспериментально преимущественную экспрессию гена *Xist* на отцовской Х-хромосоме.

В настоящее время считается доказанным, что инактивация начинается в единственном центре XIC (от англ. *X-chromosome inactivation center*), а затем прогрессивно

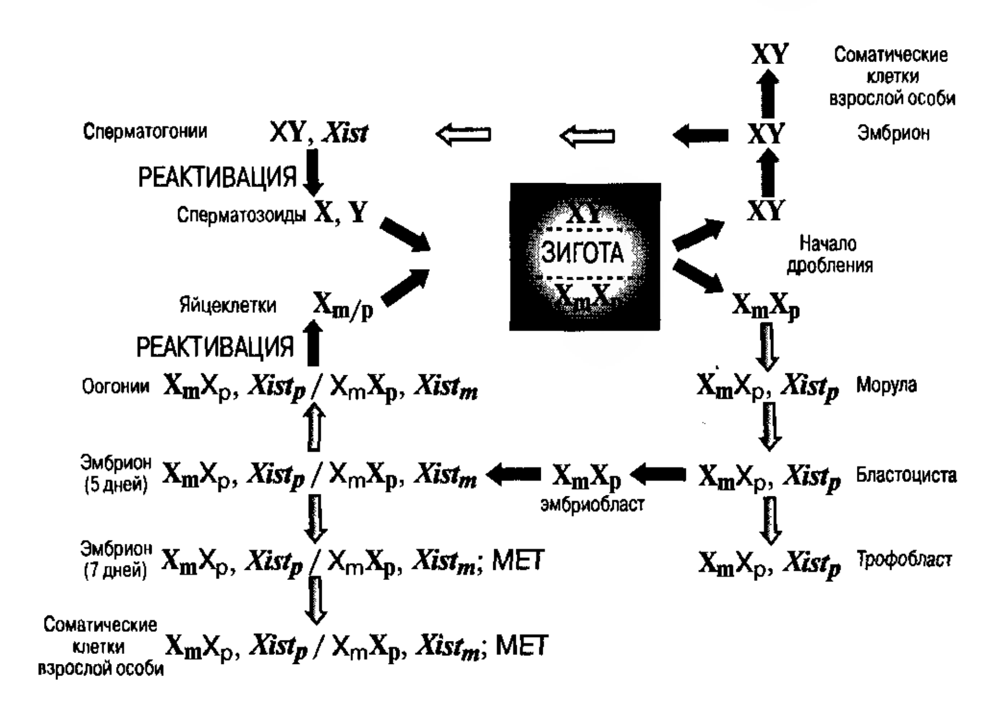


Рис. 12.11. Схема активации-инактивации X-хромосомы мыши. (По: Lyon, 2002)

Обозначения: X_p (paternal) – отцовская X-хромосома, X_m (maternal) – материнская X-хромосома. MET – метилирование гена Xist. Более тонкий шрифт – инактивированное состояние.

распространяется вдоль всей длины хромосомы по закону «все или ничего». Все гены одной хромосомы инактивируются, а гены другой – остаются активными. Однако на X-хромосоме человека в трех отдельных районах локализованы 8 генов, не подвергающихся инактивации, причем один из них активен исключительно на инактивированной X-хромосоме, а семь – на обеих.

На картах митотических хромосом человека и мыши локализованы центры инактивации. Предполагается, что X-хромосома остается активной до тех пор, пока не получит сигнал инактивации из такого центра. В районе ДНК протяженностью 50 т.п.н., который он занимает, находятся 4 компонента: *Xce*, *Xist*, *Tsix* и *DXPas34*, играющие важную роль в инактивации X-хромосомы. Оказалось, что ген *Xce* (от англ. *X-chromosome-controlling element*) мыши, представленный тремя аллелями, контролирует выбор для инактивации одной из родительских X-хромосом.

Ген *Xist* (от англ. *X-inactive-specific transcript*) кодирует нетранслируемую РНК, необходимую для инактивации X-хромосомы. Его экспрессия обнаруживается в тех клетках, где X-хромосома неактивна, но отсутствует у самцов и особей XO. У человека полная последовательность гена *XIST*, имеющего несколько сайтов начала транскрипции, составляет более полутора десятков т.п.н. и включает 8 экзонов (рис. 12.12).

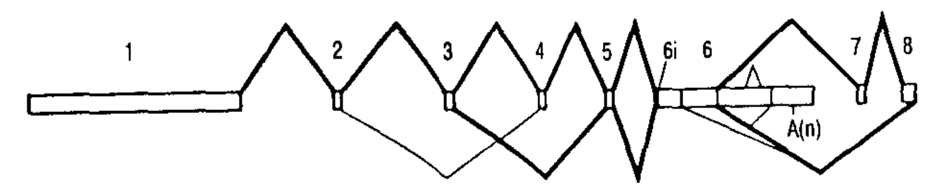


Рис. 12.12. Экзон-интронная организация гена *XIST* человека. (Из: Нестерова и Закиян, 1994)

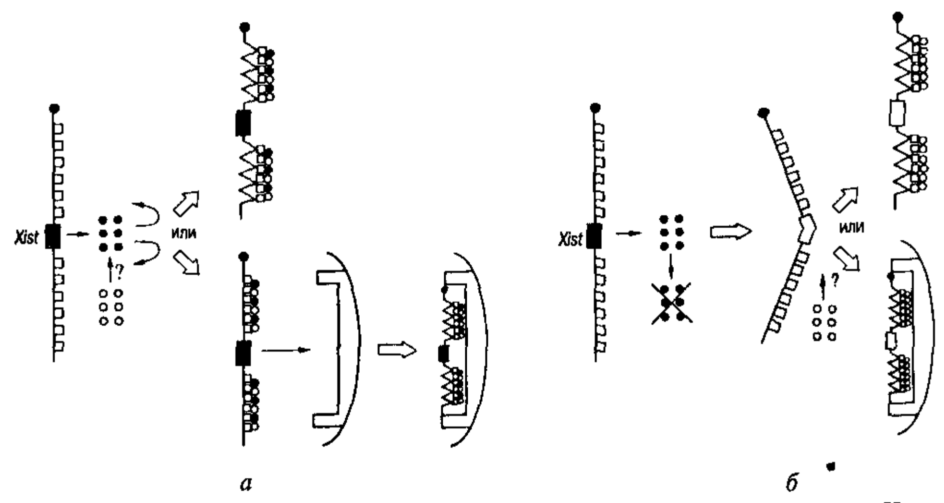


Рис. 12.13. Две модели участия гена *Xist* мыши в инактивации Х-хромосомы. Черные кружки – Xist-РНК, светлые квадраты – хроматин, светлые кружки – промежуточные ядерные факторы; зигзаг – гетерохроматизация. (Из: Нестерова и Закиян, 1994)

а - Xist-PHK локально взаимодействует с хроматином той Х-хромосомы, с которой инициируется транскрипция. Взаимодействие может быть прямым (что приводит к гетерохроматизации) или опосредованным (через промежуточные ядерные факторы) В последнем случае образуется лиганд для переноса и/или прикрепления к сайту на ядерной мембране,в котором находится аппарат инактивации; б транскрипция через локус Xist вызывает изменения в локальной структуре хроматина, что приводит к гетерохроматизации, открывая доступ другим ядерным факторам или открывая сайт, взаимодействующий с аппаратом инактивации

Tsix представляет собой РНК, контролирующую экспрессию гена *Xist*. Эта РНК транскрибируется с параллельной (антисмысловой) цепи ДНК гена *Xist*. Активация *Tsix* происходит под влиянием локуса *DXPas34*, содержащего 34-членный повтор сателлитной ДНК.

Существует несколько моделей инактивации Х-хромосомы с участием гена *Xist*. Часть из них предполагает существование двух факторов, один из которых (продуцируемый кратковременно и в очень ограниченном количестве) блокирует инактивацию, а другой запускает ее. Как один из вариантов рассматривается возможность инициации транскрипции гена *Xist* в результате произошедшего связывания гипотетического сигнала с центром инактивации. Предполагается, что дальше *Xist* может инициировать гетерохроматизацию локализованных вблизи него участков Х-хромо-

ы. Согласно другой гипотезе что ген *Xist* у мышей представляет собой центр инавации, ответственный за все ее этапы, начиная с выбора экспрессируемого аллеи заканчивая распространением и поддержанием инактивации. Две модели, баюющиеся на этой возможности, представлены на рис. 12.13.

Инактивация Х-хромосомы в соматических клетках у плацентарных млекопитаюих чрезвычайно стабильна. Напротив, инактивация у сумчатых млекопитающих ма лабильна: реактивацию Х-хромосомы можно обнаружить как *in vivo*, так и в очных культурах разных тканей. Таким образом, наблюдается межвидовая вари- стабильности инактивированного состояния Х-хромосомы и внутривидовая — и разных Х-сцепленных генов.

Установлено наличие небольших групп генов (в псевдоаутосомных районах), осщихся активными в инактивированной Х-хромосоме и имеющих гомологов в Y-мосоме. Кроме них, в коротком плече, и в дистальном отделе длинного плеча Х-мосомы есть гены, сохраняющие активность в инактивированной Х-хромосоме. ыши соответствующие гены в норме инактивируются. Разница в составе инактиемых генов у человека и мыши может объяснить разные последствия появления ей с аномальным числом Х-хромосом у этих видов. Так, у человека большинст- индивидов женского пола с кариотипом ХО погибает на эмбриональной стадии ития, а выжившие имеют заметные фенотипические аномалии, тогда как самки у мыши внешне совершенно нормальные. Наличие аномалий у женщин ХО мобыть связано с недостаточным количеством продукта генов, исключенных из инаации, вследствие отсутствия второй Х-хромосомы. Напротив, у индивидов с доительной Х-хромосомой врожденные пороки развития могут быть результатом точной дозы этих генов.

12.4. РЕГУЛЯЦИЯ ГЕННОЙ АКТИВНОСТИ НА УРОВНЕ РЕПЛИКАЦИИ

которых случаях увеличение количества продукта гена достигается за счет увения числа его копий. Наиболее известный пример амплификации (умножения) — ократная избирательная репликация генов рРНК в ооцитах амфибий. Такой тип яции репликации обеспечивает накопление большого количества копий опредеых генов и их дальнейшую транскрипцию. В ооците один набор рибосомных в каким-то образом отсоединяется от хромосомы (либо копируется) и сворачися в кольцо. В одной из цепей этого кольца происходит разрыв (ник) и с этого начинается синтез ДНК в обоих направлениях. С помощью такого механизма ищегося кольца» образуются идентичные копии рибосомных генов и разделяюих последовательности спейсеров. На стадии пахитены в профазе мейоза обрася экстрахромосомные ядрышки за счет амплификации рибосомных генов, скрипция с которых происходит на стадии диплотены. Первичные транскрипибосомных генов после процессинга и образования зрелых РНК используются образования рибосом.

Известна амплификация генов белков хориона в фолликулярных клетках у дрозофилы, но в отличие от рибосомных эти гены остаются присоединенными к хромосоме. После многократных циклов репликации ДНК в этих областях образуются многоцепочечные структуры в виде ветвей, когда в пределах одной вилки репликации образуется новая вилка.

12.5. ТРАНСЛЯЦИОННАЯ И ПОСТРАНСЛЯЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ

Регуляция процесса трансляции того или иного белка необходима для синтеза достаточного его количества на определенной стадии онтогенеза. При этом для образования олигомерного белка требуется скоординированный синтез и определенное численное соотношение различных его субъединиц. Кроме того, активация или инактивация белков осуществляется либо с помощью различных модификаций их структуры либо путем образования/ разрушения функциональных белковых комплексов.

Пути трансляционной и постранcляционной регуляция генной экспрессии весьма многообразны, рассмотрим только некоторые из них. Одним из механизмов контроля экспрессии генов является изменение последовательности пар нуклеотидов в **5′ и 3′-концах мРНК**, модификация которых может изменить длительность жизни мРНК. Так делеции AU последовательности в 3'-нетранслируемом участке мРНК, транскрибированной с гена *c-fos*, приводят к увеличению концентрации и продолжительности жизни матричной РНК, накоплению белка, стимулирующего деление клеток фибробластов, и в конце концов к образованию опухоли. Показано, что на время жизни мРНК также влияет изменение и первых кодонов 5′- области гена, определяющих, сигнальную последовательность полипептидной цепи, например тубулина.

Пример значительной задержки трансляции мРНК у эукариот демонстрируют долгоживущие цитоплазматические рибонуклеопротеиновые частицы (**ннформосомы**) в ооцитах морского ежа, РНК которых транслируется только после оплодотворения. Известными являются также данные, что раннее развитие контролируется факторами, запасенными или синтезированными в ооците в случае, например, материнского типа наследования (см. гл.16).

Один из способов регуляции – **образование вторнчных структур** в виде шпилек в районе инициирующего кодона, верхняя часть которых – петля, образованная из неспаренных оснований. Кодоны AUG, находясь в районе стебля, блокируют трансляцию. Кроме того, есть регуляторные белки, которые, связываясь с инициирующим кодоном, репрессируют трансляцию.

Репрессня трансляции *осуществляется при наличии избытка* белка, т. е. основана на принципе обратной связи. Так, белок S7 репрессирует свою собственную трансляцию, и вместе с тем является регуляторным белком по отношению к рядом расположенному в опероне гену фактора транслокации (EF-G).

Регуляция процесса трансляции может быть обеспечена сменой матричных РНК в зависимости от **условий среды** и потребности клетки. Например, синтез ферритина в клетках млекопитающих регулируется с помощью железа на трансляционном уровне. В 5'- лидерной области ферритиновой мРНК была обнаружена область из четырех десятков п.н., участвующая в регуляции синтеза ферритина с помощью железа. Эта область содержит шпилечную структуру, с которой связывается регуляторный белок, блокируя доступ рибосом к началу трансляции мРНК ферритина. Таким способом эта мРНК реагирует на увеличение концентрации железа. Эффективность трансляции зависит также от такого средового фактора как pH клетки – увеличение значения pH с уровня 6.9 (характерного для ооцита) до уровня 7.4 (присущего зиготе) приводит к значительному увеличению белкового синтеза.

Активация/инактивация белков зависит от их **посттрансляционной модификации: фосфорилирования, ацетилирования, метилирования**. Так фосфорилирование/дефосфо-рилирование служит одним из механизмов регулирования активности регуляторных белков и ферментов. Некоторые гормоны, стимулируя фосфорилирование негистоновых белков (НГБ), усиливают транскрипцию. Фосфорилирование фактора, инициирующего трансляцию у эукариот eIF-2, приводит к остановке синтеза белка. При инактивации протеинкиназы фактор eIF-2 не фосфорилируется и, связываясь с фактором eIF-2B, удаляется из рибосомы, что приводит к продолжению синтеза белка (например, α- и β-полипептидных цепей, входящих в состав гемоглобина HbA). В случае фосфорилирования гистонов с участием гистоновых киназ число отрицательных зарядов на гистон увеличивается, и это может привести к их отделению от ДНК и деконденсации хроматина.

Другой пример. Некоторые вирусные онкогены кодируют белки с тирозинкиназной активностью. Клеточный онкоген *c-src* ($p60^{src}$-протеинкиназа) может быть активирован путем фоосфорилирования тирозина. Белок src способен фосфорилировать субъединицу фактора p34, участвующую в стимуляции бесконтрольного деления клетки.

Путем ковалентных модификаций изменяется ионный состав гистонов и их стерические свойства, от которых зависит взаимодействие с молекулой ДНК. Так, ацетилирование гистонов ведет к развороту нуклеосомных частиц, поскольку модифицированные таким образом гистоны связываются с ДНК менее эффективно.

Большое значение в процессах регуляции активности генов имеет метилирование как молекул ДНК, так и гистонов, входящих в структуру нуклеосом. Метилирование усиливает основность гистонов и связь с ДНК. Хотя метилирование гистонов происходит после их синтеза, эта модификация сказывается в процессах репликации и транскрипции. Эти изменения гистонов нарушают процесс деспирализации нуклеосом перед началом синтеза ДНК или ее транскрипции.

Глава

13 ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МУТАЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ

Несмотря на эффективность систем, поддерживающих идентичность генетического материала при его воспроизведении, консерватизму наследственности всегда сопутствует и противостоит наследственная изменчивость – способность генетического материала претерпевать изменения, наследуемые в потомстве.

Наследственная изменчивость организмов состоит из:

- *комбинативной изменчивости*, обеспечиваемой перекомбинированием генов, хромосом и их сегментов, несущих различные аллели, что выражается в разнообразии организмов-потомков, получивших новые (иные, чем у родителей) комбинации аллелей в результате случайного сочетания при оплодотворении и вследствие кроссинговера, а также
- *мутационной изменчивости*, являющейся результатом возникающих стойких изменений генов и/или хромосом, которые обусловливают заметные качественные изменения наследственных признаков (подвергаясь отбору, они либо сохраняются в популяциях, либо элиминируются).

Термин «мутация» предложил голландский ботаник Гуго де Фриз в своем классическом труде «Мутационная теория» (1901–1903 гг.), основные положения которого до сих пор не утратили значения:

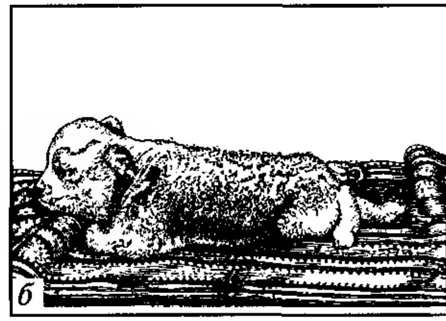
- мутации возникают внезапно, дискретно, без переходов;
- они константны в своем проявлении;
- мутации наследуются;
- они могут быть как полезными, так и вредными (добавим, а также – нейтральными);
- выявление мутаций зависит от количества проанализированных особей;
- одни и те же мутации могут возникать повторно, хотя и с низкой частотой.

Таким образом, под мутациями подразумеваются дискретные, стабильные изменения наследственного материала, приводящие к изменению фенотипа. Процесс возникновения мутаций называют мутационным, или **мутагенезом** (последний термин чаще употребляют в отношении индуцированных мутаций). Организм, приобретший какой-либо новый признак и тем самым изменивший свой фенотип в результате мутации, называют **мутантом** (рис. 13.1).

Впервые теорию непрерывно идущего в органическом мире мутационного процесса, в результате которого от константных видов «временами отщепляются новые формы», выдвинул С.И. Коржинский – российский академик, директор ботанического сада при Петербургском университете. Книга С.И. Коржинского «Гетерогенезис и эволюция», изданная в России в 1899 г. и переведенная на немецкий язык в 1901 г., стала известна Г. де Фризу в процессе его работы над «Мутационной теорией» и послужила объектом цитирования и обсуждения.

Дикий тип Bar cut rudimentary

а vestigial Curly bithorax



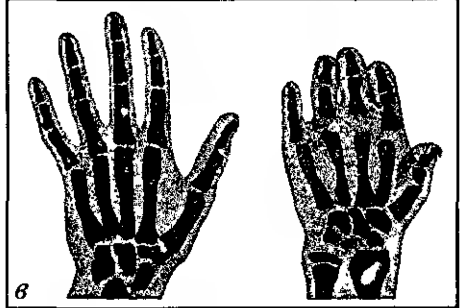


Рис. 13.1. Примеры мутаций.

а - мутации формы глаз и крыльев у дрозофилы. (Из: Griffiths et al , 2000)

Bar узкие глаза; cut – вырезанные крылья; rudimentary маленькие (рудиментарные) крылья; vestigial - редуцированные крылья; Curly - загнутые вверх крылья; bithorax – удвоенный грудной отдел;

б - бульдогообразный теленок норвежского телемарковского скота. (Из: Натали, 1937) Гомозиготные формы нежизнеспособны вследствие специфического строения черепа, обусловленного действием рецессивного гена;

в нормальная и короткопалая кисть руки человека. (Из: Натали, 1937).

На рентгенограмме видно, что у пораженного индивида не только укорочены фаланги, но и редуцировано их число у II-V пальцев. Короткопалость (брахидактилия) обусловлена аутосомным доминантным геном.

Определение характера и частоты мутаций – тончайший экспериментальный прием, широко используемый генетиками для решения многих фундаментальных

проблем. Но особая важность детального изучения мутационного процесса обусловлена тем, что именно мутации служат первоосновой многих наследственных болезней человека. Следовательно, проблема профилактики наследственной патологии хотя бы частично может быть решена только при выяснении механизма становления мутаций.

Охарактеризовать с современных позиций такое сложное, многообразное явление как мутационный процесс чрезвычайно трудно. Сложность этой задачи лучше всего иллюстрирует многообразие подходов к классификации мутаций.

13.1. ОБЩАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ МУТАЦИЙ

Мутации различают

1) *по происхождению:*
   - спонтанные (возникают самопроизвольно),
   - индуцированные (возникают при экспериментальном воздействии на генетический материал);
2) *по проявлению в гетерозиготном состоянии:*
   - доминантные,
   - рецессивные;
3) *по направлению:*
   - прямые (переводят состояние дикого типа в качественно иное состояние),
   - обратные (иначе – реверсии, возвращают мутантное состояние к дикому типу);
4) *по уровню организации изменяемого генетического материала:*
   - геномные,
   - хромосомные,
   - генные;
5) *по силе проявления аллелей:*
   - гиперморфные (приводят к усилению действия гена за счет увеличения количества синтезируемого под его контролем продукта),
   - гипоморфные (ослабляют действие гена за счет уменьшения количества биохимического продукта, кодируемого аллелем дикого типа),
   - неоморфные (кодируют синтез продукта, отличающегося от синтезируемого под контролем аллеля дикого типа, и не взаимодействуют с ним),
   - аморфные (инактивируют действие гена),
   - антиморфные (действуют противоположно аллелям дикого типа);
6) *по влиянию на жизнеспособность и/или плодовитость особей:*
   - летальные (обусловливают гибель мутанта),
   - полулетальные (снижают жизнеспособность, мутанты обычно не доживают до репродуктивного возраста; согласно другому подходу, полулетальные мутации обусловливают гибель половины несущих их особей),
   - условно летальные (мутации не проявляются в одних – пермиссивных – условиях и летальны в других – непермиссивных – условиях),

- стерильные (не влияют на жизнеспособность, но резко снижают плодовитость),
- нейтральные (не влияют на жизнеспособность и плодовитость),
- повышающие жизнеспособность и плодовитость особей (жизнеспособность количественно характеризует уровень выживаемости выборки рассматриваемого фенотипического класса по сравнению с другой выборкой в идентичных условиях внешней среды; под плодовитостью подразумевается способность организмов приносить жизнеспособное потомство; часто плодовитость характеризует число потомков одной особи женского пола, родившихся на протяжении ее репродуктивного периода);

7) *по характеру регистрируемого проявления*:
- морфологические,
- физиологические,
- поведенческие (этологические),
- биохимические и другие (подобное деление мутаций весьма условно: любой признак имеет биохимическую основу, физиологический механизм и морфологическое выражение);

8) *по локализации изменяемого генетического материала*:
- цитоплазматические (митохондриальные, пластидные),
- ядерные;

9) *по месту возникновения и характеру наследования*:
- генеративные (они возникают в клетках полового зачатка и в половых клетках и передаются по наследству. При этом мутация, появившаяся на стадии яйцеклетки или сперматозоида, останется единичной, а мутация, возникшая на ранней стадии оогенеза или сперматогенеза, размножится в количестве, пропорциональном числу прошедших клеточных делений, при этом часть зрелых половых клеток будет нести мутантный аллель, а у другой части генотип останется неизмененным);
- соматические (они возникают в соматических клетках и либо приводят к появлению мозаиков/химер у организмов, размножающихся исключительно половым путем, либо наследуются у организмов, имеющих бесполое размножение. Если из мутировавшей соматической клетки растения развивается почка, а из нее – побег, то он будет нести мутантный признак и в перспективе может дать начало новому виду, а в случае селекции – новому сорту).

13.1.1. ГЕНОМНЫЕ МУТАЦИИ

К этому классу мутаций относятся изменения кариотипа, выражающиеся в уменьшении/увеличении числа хромосомных наборов либо числа отдельных хромосом. Существует несколько типов геномных мутаций.

1. **Гаплоидия** – уменьшение числа хромосом в кариотипе вдвое. Соматические клетки гаплоидного организма содержат одинарный (гаплоидный) набор хромосом (n).

Фенотип гаплоидов имеет следующие особенности:

- у них проявляются рецессивные гены;

- гаплоидные организмы мельче диплоидных, поскольку их клетки вследствие уменьшения дозы генов имеют меньший размер;
- гаплоиды почти бесплодны, поскольку хромосомы не имеют гомологов, и в процессе мейоза образуются несбалансированные гаметы. В редких случаях могут сформироваться гаметы с нередуцированным гаплоидным набором хромосом. У растений слияние таких гамет в процессе самоопыления или при искусственной полиплоидизации дает диплоидную гомозиготу по всем генам, что весьма ценно для решения определенных селекционных задач.

Естественная гаплоидия встречается в жизненном цикле низших грибов, бактерий и одноклеточных водорослей. У некоторых видов членистоногих и насекомых гаплоидными являются самцы, развивающиеся из неоплодотворенных клеток (см. гл. 8). Экспериментально гаплоидные формы были получены у пшеницы, кукурузы и некоторых других растений при опылении их либо пыльцой отдаленного вида, либо пыльцой, хромосомный аппарат которой был инактивирован облучением (оба способа стимулировали партеногенетическое развитие яйцеклетки). Гаплоидных зародышей удавалось получить и у животных. Для этого яйцеклетки либо охлаждали, что иногда заставляет их развиваться партеногенетически, либо оплодотворяли спермиями, хромосомы которых были предварительно инактированы облучением.

У человека гаплоидный набор хромосом содержится в норме только в гаметах.

2. **Полиплоидия** – кратное увеличение числа хромосомных наборов в клетке. Обычно соматические клетки содержат диплоидный набор хромосом (2n), но иногда возникают триплоидные (3n), тетраплоидные (4n) и т.д. клетки и даже целые организмы.

Полиплоиды с повторенным несколько раз одним и тем же набором хромосом называют *аутополиплоидами*, а полученные от скрещивания организмов, принадлежащих к различным видам, – *аллополиплоидами*.

Исключительно велика роль полиплоидии в происхождении культурных растений и их селекции. Полиплоидными являются все или большинство культивируемых сортов пшеницы, овса, риса, сахарного тростника, арахиса, свеклы, картофеля, сливы, яблони, груши, апельсина, лимона, земляники, малины. К этому перечню следует добавить тимофеевку, люцерну, табак, хлопчатник, розы, тюльпаны, хризантемы, гладиолусы и многие другие, возделываемые человеком, культуры. Аутополиплоидные мутанты растений обычно крупнее исходной формы. Тетраплоиды, как правило, имеют большую вегетативную массу. Однако у них может резко уменьшиться плодовитость из-за нерасхождения поливалентов в мейозе. Триплоиды – крупные и мощные растения, но полностью или почти полностью стерильные, поскольку продуцируемые ими гаметы содержат неполный набор хромосом. Аутополиплоидные виды размножают вегетативным способом, поскольку плоды таких растений не содержат семян.

У животных аутополиплоиды известны в основном среди гермафродитов (например, земляных червей) и у видов с партеногенетическими самками – дающими жизнеспособное потомство без оплодотворения (некоторые насекомые, ракообразные, рыбы). Такое весьма ограниченное значение полиплоидии в животном мире обусловлено тем, что она нарушает баланс между аутосомами и половыми хромосомами, и немногие аллополиплоидные формы, полученные человеком, как правило, бесплодны.

Полиплоидия может возникнуть в результате: 1) нарушения расхождения хромосом в митозе; 2) слияния клеток соматических тканей либо их ядер; 3) нарушений мейоза, приводящих к образованию гамет с нередуцированным числом хромосом.

Для многих видов описаны специфические гены мейоза. Из высших растений наиболее полно изучены в отношении генетики мейоза арабидопсис, кукуруза, рожь и томаты. В составе их геномов в настоящее время известно от 15 до 30 мейотических генов, мутации в которых (мейотические мутаций) нарушают инициацию и правильность протекания этого процесса. В частности, у кукурузы известны мутации: *am* – неинициируемость мейоза, *afd* – отсутствие конъюгации хромосом, *dsy* – неполная конъюгация и другие. Все эти мутации проявляются независимо друг от друга от друга, что свидетельствует о независимом генном контроле отдельных этапов мейоза. Гены, влияющие на мейоз, описаны и у дрозофилы. Один из 82-х таких генов, *mei-9*, локализован в Х-хромосоме и контролирует мейотическую рекомбинацию у самок.

Знание описанных выше механизмов позволяет искусственно вызывать полиплоидные мутации, что успешнее всего достигается действием физических (облучение, изменение температуры или гидростатического давления) и химических (наркотики, алкалоиды и др.) факторов, повреждающих веретено деления клетки. Первый искусственный растительный аллополиплоид, названный *Raphanobrassica* (гибрид редьки и капусты, имеющих в наборе по 9 пар хромосом), был получен советским генетиком Г. Д. Карпеченко в 1928 г. А почти через 40 лет после этого Б.Л. Астаурову с сотрудниками удалось искусственно получить аллотетраплоидный гибрид двух видов шелкопряда *Bombyx*.

У человека более 20% всех спонтанных абортусов с аномальным кариотипом имеют триплоидный набор хромосом. Среди описанных в литературе немногим более трех десятков индивидов, имеющих триплоидный набор хромосом, есть девочки с кариотипом 69,XXX и мальчики – 69,XXY. Продолжительность жизни детей с триплоидным набором хромосом крайне мала. Практически все они погибают в первые часы или дни после рождения. Причиной этого являются серьезные пороки центральной нервной системы (гидроцефалия, спинномозговые/черепно-мозговые грыжи), а также пороки сердечно-сосудистой системы. Возникновение триплоидии может быть связано: 1) с нерасхождением хромосом в первом делении мейоза у одного из родителей, 2) с нарушением второго деления мейоза, 3) с теоретически возможным оплодотворением одной яйцеклетки двумя спермиями. Так или иначе, в литературе нет ни одного описания повторного рождения в семье ребенка с триплоидией. Случаи мозаицизма по триплоидии (девочки с кариотипом 46,XX/69,XXX и мальчики – 46,XY/69,XXY) описаны у нескольких детей, доживших до 10 лет.

Тетраплоидию у человека наблюдали только в материале спонтанных абортов.

3. **Анеуплоидия** (анеусомия) – не кратное гаплоидному набору изменение числа хромосом в клетках организма за счет потери или добавления отдельных хромосом.

Нуллисомия – отсутствие обоих гомологов какой-либо одной (или, весьма редко – большего числа) пар хромосом; общее число хромосом в такой клетке равно (2n-2). Нуллисомия характерна для некоторых сортов мягкой пшеницы *Triticum aestivum* (рис. 13.2), полученных в результате скрещивания между собой моносомных (см. ниже) растений. Основной механизм возникновения нуллисомии – потеря в про-

цессе мейоза хромосомы, не имеющей партнера. У других растений нуллисомики являются нежизнеспособными. Случаев нуллисомии у человека не описано.

Моносомия – утрата одного из гомологов по одной или большему числу пар хромосом, число хромосом равно (2n-1). Этот вариант анеусомии хорошо изучен на растениях табака *Nicotiana tabacum*, у которого найдено 24 разных моносомика соответственно 24 парам хромосом, а также установлена связь между определенными хромосомами и признаками растения.

Наиболее известная моносомия у человека носит название синдрома Шерешевского–Тернера: женщины с кариотипом 45,ХО имеют только одну половую Х-хромосому. Гораздо чаще встречаются мозаики с кариотипом 46,ХХ/45,ХО.

Полисомия – избыточное число гомологичных хромосом на одну, реже – на большее число хромосом в наборе. Наличие одной дополнительной гомологичной хромосомы приводит к трисомии (2n+1), двух – к тетрасомии (2n+2).

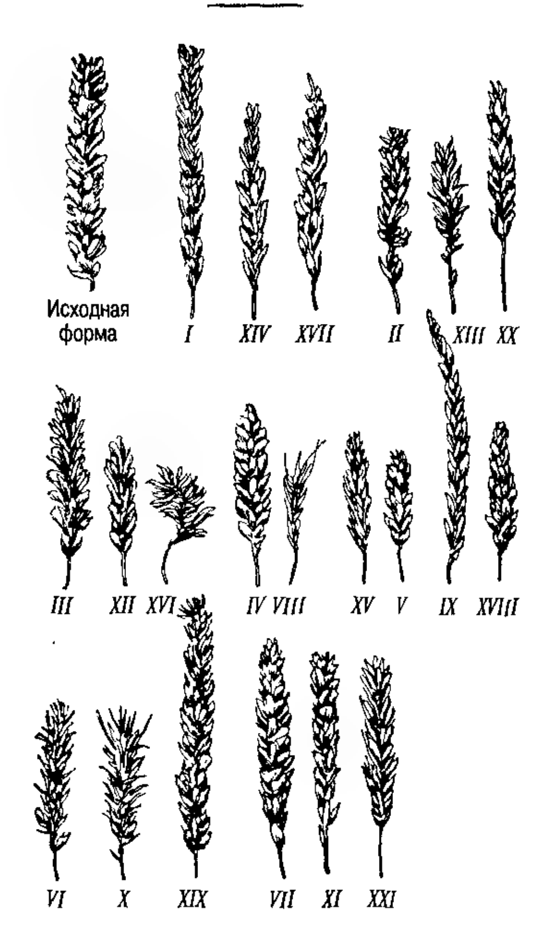


Рис. 13.2. Колосья нуллисомиков пшеницы *Triticum aestivum* сорта «Чайниз спринг». (Из: Гершензон, 1983)

Изменения вызваны отсутствием одной из 21 пары гомологичных хромосом, цифры указывают номер отсутствующей пары

Трисомные формы хорошо изучены у растений и животных. Так, в процессе изучения 12 пар хромосом дурмана *Datura stramonium* были обнаружены растения, у которых одна из хромосом представлена не в двойном, а в тройном количестве. Позже были найдены трисомики по каждой из 12 пар хромосом, причем каждое из растений имело совершенно определенный фенотип (рис. 13.3). У дрозофилы хорошо изучены особи с лишней точечной четвертой хромосомой и полисомики по Х-хромосоме (см. гл. 8).

У мужчин описан синдром Клайнфельтера с трисомией по половым хромосомам 47,XXY и его варианты: с тетрасомией – 48,XXXY, либо – 48,XYYY, либо – 48,XXYY, а также с пентасомией – 49,XXXXY либо – 49,XXXYY.

Как определенная нозологическая единица у женщин выделена полисомия по половым хромосомам: синдром трипло-Х, а также тетра- и пентасомия по Х-хромосоме.

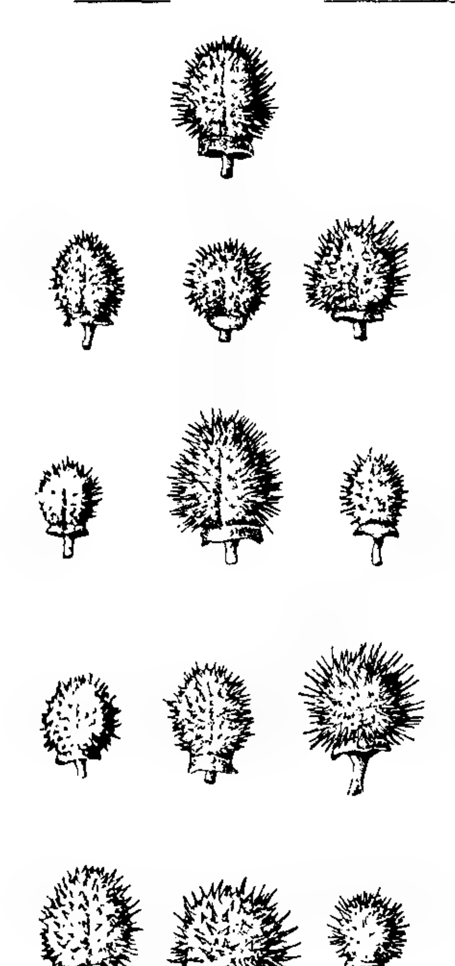


Рис. 13.3. Семенные коробочки у различных типов трисомиков дурмана *Datura stramonium*. (Из: Гершензон, 1983)

Вверху - нормальное диплоидное растение (2n=24), под ним – трисомики по каждой из хромосом гаплоидного набора (n=12)

Изменения, связанные с нарушениями хромосомного баланса у человека, при которых имеет место трисомия по двум парам хромосом, обозначаются как двойные трисомии. Известные из литературы двойные трисомики представлены индивидами, имеющими сочетание трисомии по Х-хромосоме с трисомией по одной из тех аутосом, при которой подобное состояние совместимо с жизнью. Индивиды с двойной трисомией проявляют некоторые фенотипические признаки, присущие трисомному состоянию каждой из двух хромосом в отдельности.

К числу наиболее распространенных синдромов с полными трисомиями по отдельным аутосомам могут быть отнесены синдромы: Патау (47,+13), Эдвардса (47,+18) и Дауна (47,+21). Большая часть эмбрионов с трисомиями по хромосомам 13 и 18 погибает на ранних стадиях развития. Частота трисомиков по хромосоме 21 довольно высока и составляет 1-2 на 1 000 новорожденных. Кроме того, у человека описаны синдромы полной трисомии по хромосомам 8, 9 и 22.

Подробно об анеусомиях у человека см. часть II. **Медицинская генетика.**

13.1.2. ХРОМОСОМНЫЕ МУТАЦИИ

Для данного класса мутаций, называемого еще хромосомными аберрациями или хромосомными перестройками, характерно изменение структуры хромосом: уменьшение или увеличение их размеров или изменение положения их частей. Существует несколько типов хромосомных аберраций.

1. **Делеции** – утрата участка хромосомы с образованием центрического (содержащего центромеру) и ацентрического (бесцентромерного) фрагментов. Делеции – результат разрывов хромосом.

Ацентрический фрагмент, как правило, теряется во время ближайшего митоза. Фрагмент, содержащий центромеру, реплицируется, и его копии нормально распределяются при клеточных делениях. Иногда разрывы происходят одновременно в обоих плечах хро-

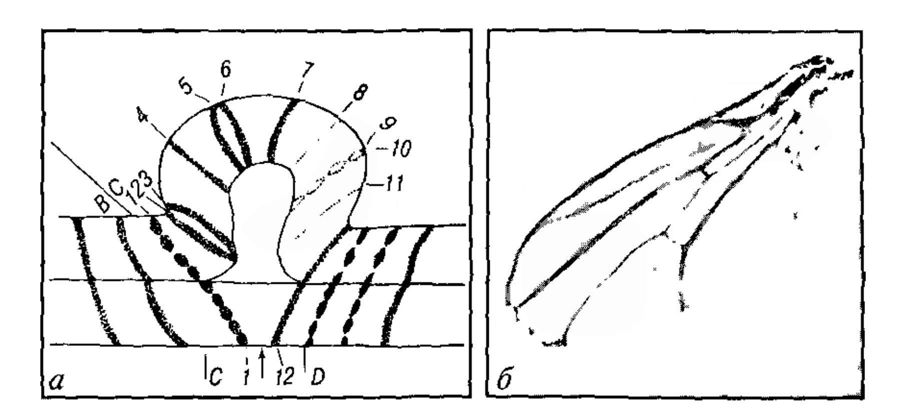


Рис. 13.4. Делеция *Notch* у дрозофилы. (Из: Дубинин, 1986)

а – делеция на участке C2-C11 у одного из гомологов Х-хромосомы, несущей мутацию Notch, «заставляет» нормальную хромосому в этом районе при конъюгации формировать петлю, б – крыло с вырезками по дистальному краю у дрозофилы, гетерозиготной по доминантному гену Notch

мосомы. Оба ацентрических конца элиминируются, а открытые концы центрического фрагмента могут соединиться с образованием кольцевой хромосомы.

Организмы, гетерозиготные по делеции, *гемизиготны* (т.е. имеют только одну дозу генов) по утраченным локусам, поэтому все рецессивные гены соответствующих локусов в интактном гомологе проявляются фенотипически. Протяженные делеции обычно летальны в гомозиготном состоянии, а также – в гемизиготном, если делеция произошла в Х-хромосоме. Мелкие делеции, как правило, не вызывают столь серьезных нарушений генного баланса и могут сохраняться в гомозиготном состоянии. Довольно часто делеции сопровождаются понижением жизнеспособности и плодовитости несущих их особей. Иногда фенотипический эффект мелких делеций имитирует генную мутацию. Делеция, получившая название мутации *Notch*, фенотипически проявляющаяся в зазубренности края крыла у дрозофилы (рис. 13.4) и обнаруженная К. Бриджесом в 1917 г., является первым описанным примером хромосомной перестройки.

Разработанный на дрозофиле специальный метод перекрывающихся делеций был использован для цитологического картирования генов у представителей многих видов.

В зависимости от локализации утерянного участка хромосомы делеции делят на:

1) *интерстициальные* — отсутствует внутренний участок, не затрагивающий теломеру;

2) *концевые* (дефишенси, или нехватки) – отсутствует теломерный район и прилежащий к нему участок. Истинность таких делеций в свете уникальной функции теломер поставлена под сомнение. В частности, до сих пор не ясно, действительно ли терминальные (концевые) нехватки, зафиксированные у множества пациентов с наследственными синдромами, например, с синдромом кошачьего крика (5p14), Вольфа-Хиршхорна (4p16) и др., образовались в результате одного разрыва.

У человека описаны синдромы частичных моносомий, возникших в результате делеций различных участков в хромосомах 4, 5, 9, 11, 13, 18, 21 и 22.

2. **Дупликации** – локальное удвоение (повторение) определенного участка хромосомы (известны также случаи многократных повторений, или мультипликаций какого-либо участка). Дуплицированный участок может быть расположен в исходной хромосоме: либо непосредственно примыкая к исходному участку (*тандемная дупликация*), либо в том же плече, но на некотором расстоянии от исходного участка, либо в другом плече исходной хромосомы. Кроме того, дуплицированный участок может быть локализован в негомологичной хромосоме, т.е. в другой группе сцепления. В случае дупликации двух идентичных генов, сходных по характеру действия и оказавшихся в разных группах сцепления, при скрещивании будет наблюдаться характерное для дигибридного расщепления полимерных генов отношение 15:1.

Одной из причин дупликаций является неравный кроссинговер, имеющий место в том случае, если на некотором участке хромосомы гомологичные локусы при конъюгации в профазе I мейоза сдвигаются друг относительно друга на некоторое расстояние. Именно этот феномен в качестве механизма возникновения тандемных дупликаций у дрозофилы на примере мутации *Bar* еще в 1925 г. предложил Альфред Стертевант (рис. 13.5). И.А. Рапопорту удалось добиться умножения этого локуса в Х-хромосоме до 8 раз. Тандемные дупликации обнаружены у нейроспоры, кукурузы, домашней мыши и других видов.

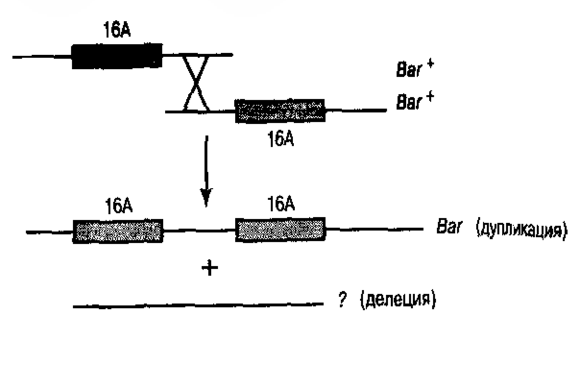
Дупликации служат источником дополнительных участков генетического материала, функция которых может быть изменена в результате мутаций и последующего отбора. За счет тандемных дупликаций относительно коротких нуклеотидных последовательностей может происходить удлинение генов.

К наиболее хорошо изученным у человека дупликациям относятся синдромы частичных трисомий по хромосомам 4, 7, 9, 12 и 14.

3. **Инверсии** - перестройки, суть которых – поворот на 180° участка, образовавшегося в результате двух разрывов, с соответствующим изменением расположения генов. Инверсии могут быть 1) *парацентрическими* (не включают центромеру в инвертированный участок, так как происходят в одном плече хромосомы) и 2) *перицентрическими* (захватывают центромеру).

Данный тип перестроек наиболее часто встречается в природных популяциях. Группа генов, локализованных в инвертированном участке, передается из поколения в поколение как единый блок, не разрываемый кроссингоаером. Особенно много данных о распространении инверсий в популяциях мух, комаров и мошек. Наличие инверсий у них легко устанавливается при микроскопическом исследовании политенных хромосом слюнных желез. Н.П. Дубинин, Н.Н. Соколов и Г.Г. Тиняков в серии работ 30–40 гг. прошлого века сформулировали механизмы эволюционного преобразования генетического материала в результате этого широко распространенного типа хромосомных мутаций.

У гетерозигот по инверсиям на цитологических препаратах выявляются характерные петли – результат конъюгации структурно измененной и нормальной хромосом. Если в инвертированном участке произойдет одиночный кроссинговер, то в случае парацентрической инверсии (рис. 13.6) возникнет одна хроматида с двумя центромерами, которые «разорвут» ее при расхождении в анафазе. Образующийся



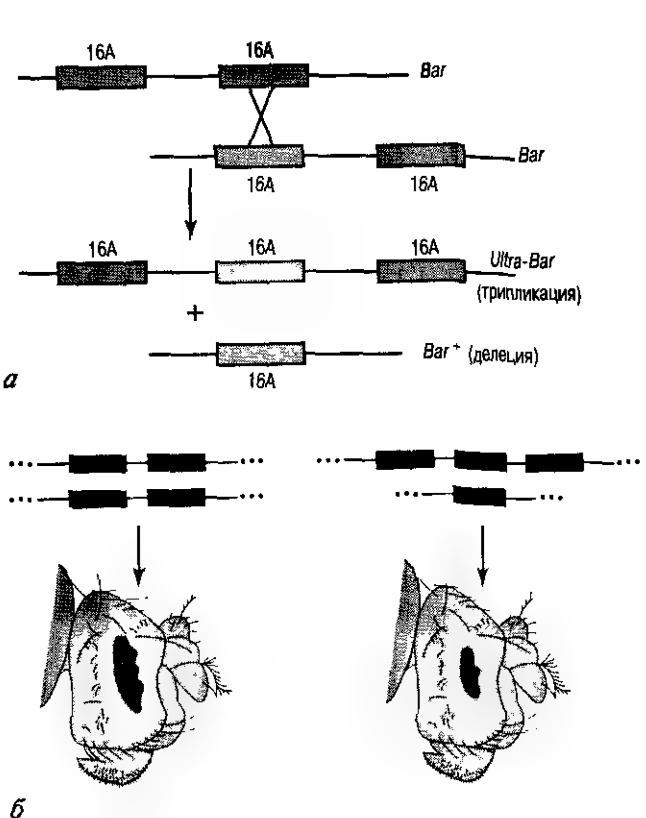


Рис. 13.5. Дупликация *Bar* у дрозофилы.

а – результат неравного кроссинговера в случае мутации Bar. Путем неравного кроссинговера могут получиться 2, 3 и большее число повторений Bar, с увеличением числа которых нарастает степень уменьшения числа фасеток глаз. (Из: Инге-Вечтомов, 1989); б – эффект положения в участке Bar. Положение дупликации в хромосоме влияет на эффективность ее экспрессии в ходе развития. Обе особи имеют по 4 участка Bar, однако число фасеток глаза гораздо меньше, если 3 участка находятся в одной хромосоме (Ultra-Bar), а четвертый в другой. (Из: Griffiths et al., 2000)

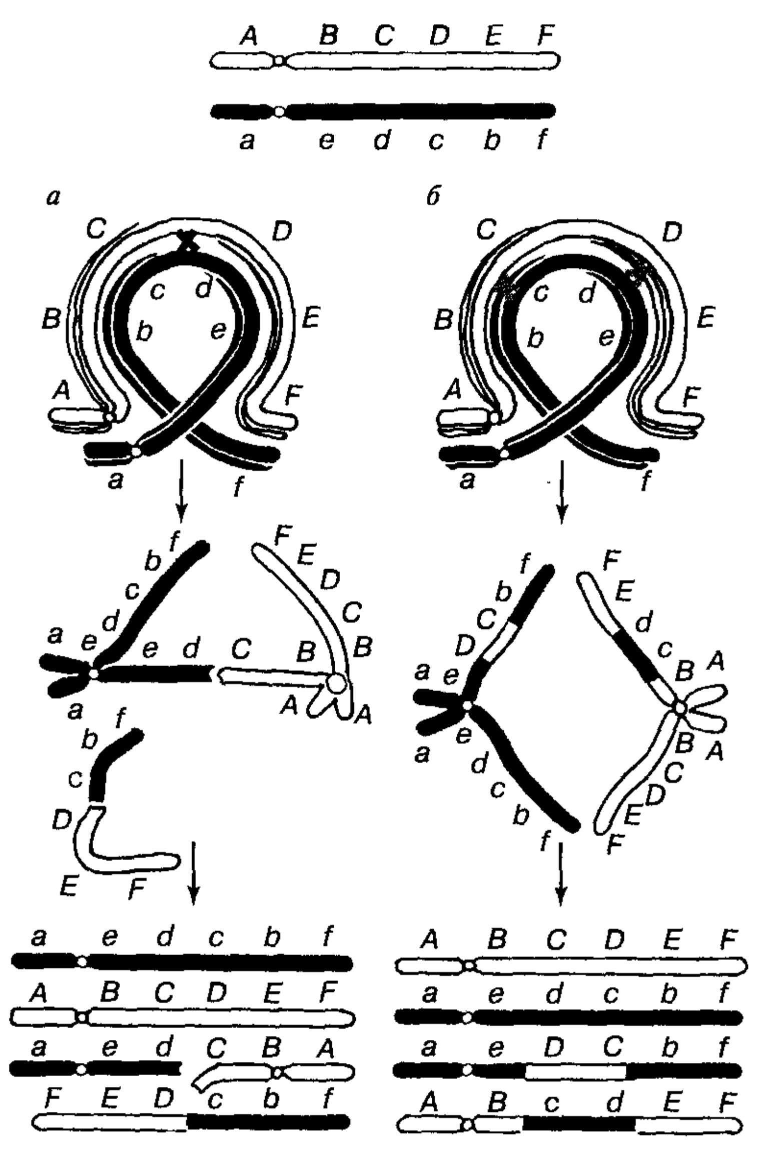


Рис. 13.6. Конъюгация хромосом и последствия одиночного (*а*) и двойного (*б*) кроссинговера при гетерозиготности по парацентрической инверсии. (Из: Инге-Вечтомов, 1989)

бесцентромерный фрагмент будет утерян. В результате, из четырех хроматид две окажутся аберрантными. При гетерозиготности по перицентрической инверсии (рис. 13.7) одиночный кроссинговер не препятствует расхождению всех хроматид. Но полноценными из четырех будут только две, так как другие две хроматиды несут делеции и дупликации нескольких генов.

Когда утраченные или удвоенные при кроссинговере участки хромосом очень малы, они не влияют на жизнеспособность гамет и образуемых при их слиянии зигот.

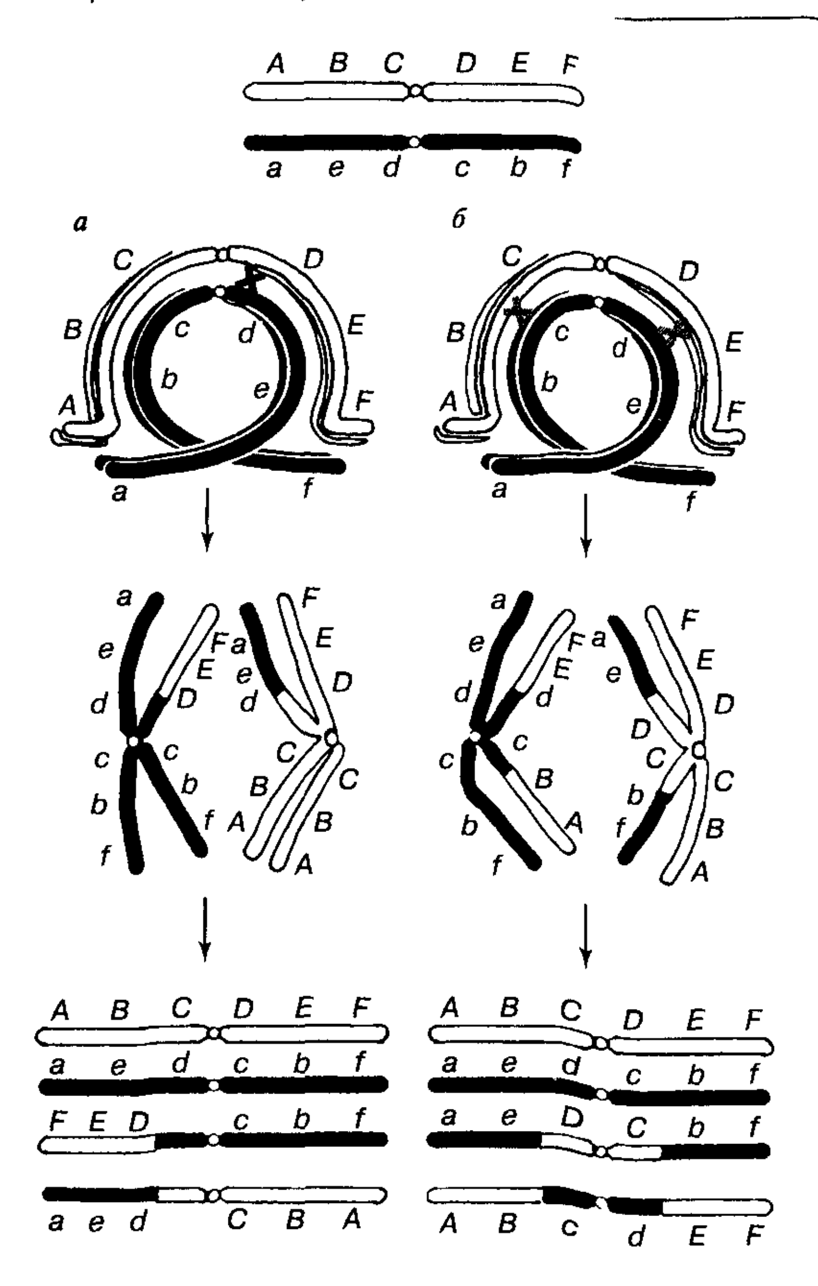


Рис. 13.7. Конъюгация хромосом и последствия одиночного (а) и двойного (б) кроссинговера при гетерозиготности по перицентрической инверсии. (Из: Инге-Вечтомов, 1989)

Если внутри инвертированного участка происходят два кроссинговера, то сохраняется полный набор генов без делеций и дупликаций и, таким образом, обеспечивается жизнеспособность рекомбинантов.

Рис. 13.8. Реципрокная транслокация. (Из: Фогель и Мотульски, 1989)

У зиготы со сбалансированной транслокацией в двух хромосомах будут комплементарные структурные аномалии

Экспериментально полученные инверсии используются как «запиратели» кроссинговера. В гл. 14 приведены примеры использования линий дрозофилы с подавленным из-за наличия инверсий кроссинговером для учета летальных мутаций.

Инверсии в хромосомах человека приводят к нарушению гаметогенеза.

4. **Транслокации** — перемещения участков хромосомы в новое положение в ее пределах или обмен участками между разными хромосомами.

Различают транслокации:

1) *симметричные* (реципрокные) – соединение центрического фрагмента одной хромосомы с ацентрическим фрагментом другой (рис. 13.8), т.е. взаимный обмен участками между двумя негомологичными хромосомами (именно реципрокную транслокацию клиницисты часто обнаруживают в семьях, где встречается более одной хромосомной аномалии).

В результате конъюгации в мейозе транслоцированные хромосомы у гетерозигот вместе со своими не перестроенными гомологами образуют характерную фигуру «транслокационного креста» (рис. 13.9). Плотная конъюгация вблизи точек разрывов оказывается затрудненной, что приводит к подавлению кроссинговера в этих участках. Поскольку гомологичные участки есть у всех четырех конъюгирующих хромосом, в профазе мейоза образуются квадриваленты. Из шести возможных типов гаплоидных продуктов, возникающих при трех способах расхождения хромосом, только два типа функционируют нормально: те, что получили полные наборы генов, характерные для исходных родительских форм. Остальные четыре типа гамет будут иметь несбалансированные хромосомные наборы: гамета будет содержать хромосому с делецией или дупликацией по отдельным участкам;

2) *асимметричные* — соединения центрических или ацентрических фрагментов, в результате которых образуются дицентрики, трицентрики и т.д.;

3) *робертсоновские* — слияние негомологичных акроцентрических хромосом в области их центромер с образованием одной метацентрической хромосомы (рис. 13.10). Транслокации этого типа названы по имени В. Робертсона, предложившего гипотезу о слиянии хромосом для объяснения уменьшения их числа в хромосомном наборе. Центрическое слияние — распространенный тип хромосомных перестроек у человека. В него могут вовлекаться все пять пар акроцентриков — хромосом с одним длинным и вторым очень коротким (иногда с трудом обнаруживаемым) плечом. При образовании робертсоновских транслокаций вместе с утратой коротких

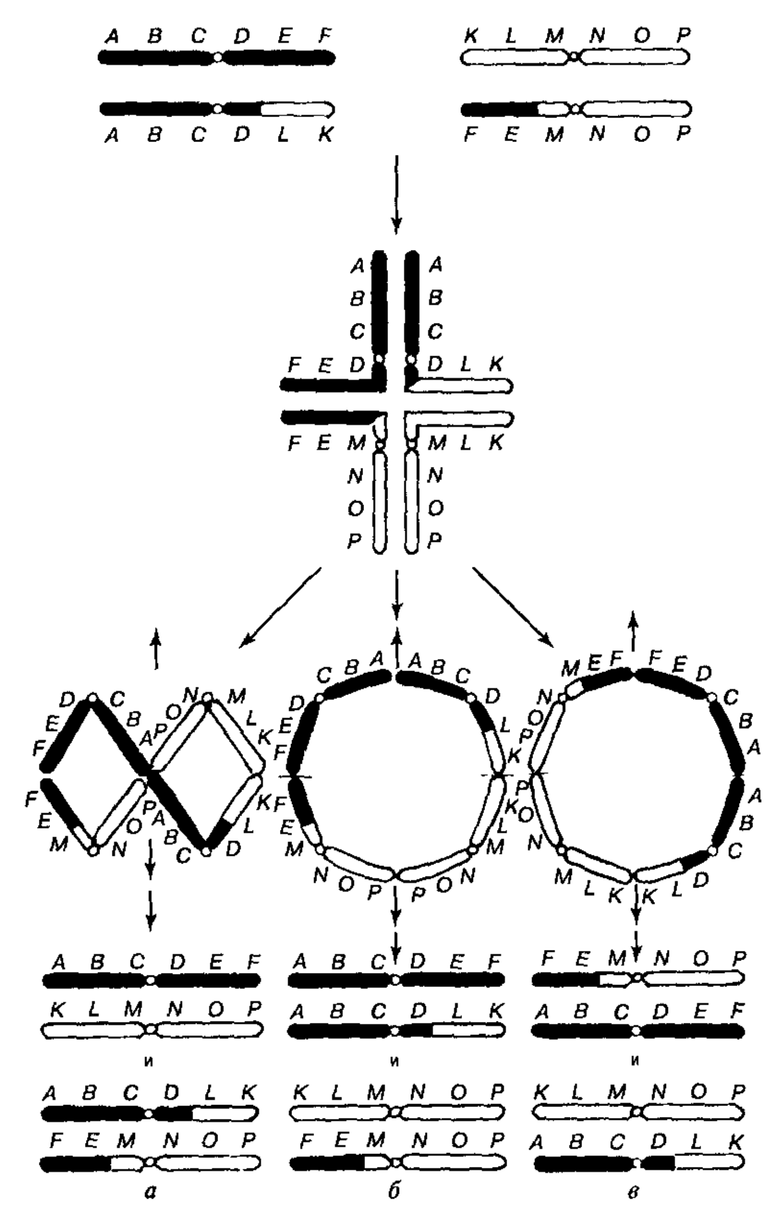


Рис. 13.9. Мейоз у гетерозиготы по реципрокной транслокации. (Из: Инге-Вечтомов, 1989)

а - две полноценные гаметы; б и в - четыре типа гамет, несущих делеции и дупликации

плеч утрачиваются и содержащиеся в них гены рибосомной РНК, что подтверждается результатами ДНК-РНК-гибридизации. Однако это не сопровождается какими-либо функциональными отклонениями, и носители таких хромосом совершенно

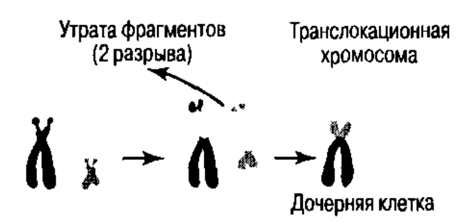


Рис. 13.10. Принцип центрического слияния (робертсоновская транслокация). (Из: Фогель и Мотульски, 1989)

Две акроцентрические хромосомы утратили свои короткие плечи, а длинные плечи слились. У сбалансированной гетерозиготы количество хромосом будет на одну меньше, чем в нормальном наборе.

здоровы. Если в ходе мейоза транслоцированная хромосома попадет в половую клетку, то зигота будет трисомной. Именно по такому типу происходит формирование транслокационного синдрома Дауна (см. часть II. **Медицинская генетика**).

13.1.3. ГЕННЫЕ МУТАЦИИ

Генные (точковые) мутации — это изменения числа и/или последовательности нуклеотидов в структуре ДНК (вставки, выпадения, перемещения, замещения нуклеотидов) в пределах отдельных генов, приводящие к изменению количества или качества соответствующих белковых продуктов.

	ГЕННЫЕ МУТАЦИИ			
ТИП	Замены нуклеотидов			Делеции и/или инсерции нуклеотидов
НАЗВАНИЕ	Миссенс-мутации	Нейтральные мутации	Нонсенс-мутации	Фреймшифт-мутации (сдвиг рамки считывания)

Замены *оснований* приводят к появлению трех типов мутантных кодонов: с измененным смыслом (*миссенс*-мутации), с неизмененным смыслом (нейтральные мутации) и бессмысленных, или терминирующих кодонов (*нонсенс*-мутации).

В результате миссенс-мутации в кодируемом данным геном полипептиде одна аминокислота замещается на другую, поэтому фенотипическое проявление мутации зависит от функциональной значимости затронутого домена. Так замены аминокислот в активных центрах белков могут сопровождаться полной потерей их функциональной активности. К примеру, миссенс-мутация в 553-м кодоне гена *FAC*, приводящая к замене лейцина на пролин, делает продукт этого гена неспособным комплементировать функциональный дефект в клетках больных анемией Фанкони.

Не всякая замена аминокислоты отразится на функциональной активности белка, вследствие чего происшедшая мутация может остаться не выявленной. Этим объясняется факт отмечаемого несовпадения частоты мутаций в определенном гене и встречаемости мутантов по нему. Кроме того, в силу вырожденности генетического кода, не всякая замена основания приведет к миссенс-мутации, возможно, она окажется нейтральной.

В результате *нонсенс*-мутации кодон, определяющий какую-либо аминокислоту, превращается в один из стоп-кодонов, не транслирующихся на рибосомах (UAA, UAG, UGA). Появление такого кодона не в конце структурного гена, а внутри него, приводит к преждевременной терминации трансляции и обрыву полипептидной цепи. *Нонсенс*-мутации обладают наибольшим повреждающим действием, так как образующиеся при преждевременной терминации трансляции белки не способны к модификации, часто не защищены от действия протеолитических ферментов и быстро деградируют.

Вставки, перемещения или выпадения отдельных оснований или их коротких последовательностей в пределах гена вызывают сдвиг рамки считывания. Природа таких мутаций была изучена при анализе аминокислотной последовательности белков фага Т4, кодируемых геном дикого типа e^+ и тремя разными мутантными генами e, содержащими взаимно супрессирующие *фреймшифт* (сдвигающие рамку считывания)-мутации. Оказалось, что некоторые единичные мутации являются следствием одновременных изменений нескольких соседних нуклеотидов. И, скорее всего, единичная мутация со сдвигом рамки возникает в результате вставки двух соседних нуклеотидов, а не одного. При возникновении мутаций со сдвигом рамки считывания меняются все триплеты ниже сайта дупликации или делеции по ходу считывания, при этом повышается вероятность возникновения стоп-кодонов и, соответственно, терминации трансляции.

С точки зрения структурно-функциональной организации генов, происходящие внутри них замены, вставки, выпадения, перемещения нуклеотидов можно объединить в следующие группы:

1) *мутации в регуляторных областях генов*

- мутации в промоторной части (например, регуляторном элементе с последовательностью PuCPuCCC и внутри ТАТА-бокса у гена β-глобина) снижают уровень синтеза белкового продукта;
- мутации в сайте полиаденилирования снижают уровень транскрипции (характерно для афроамериканцев, страдающих β-талассемией; подробно о гемоглобинопатиях см. часть II **Медицинская генетика**).

Таким образом, мутации в регуляторных 5′ и 3′-нетранслируемых областях генов вызывают количественные изменения соответствующих продуктов и проявляются фенотипически (клинически) в зависимости от порогового уровня белков, при котором их функция еще сохраняется;

2) *мутации в кодирующих областях генов*

- мутации в экзонах могут приводить к преждевременному окончанию белкового синтеза. Именно это происходит, к примеру, в случае β-талассемии: в результате мутаций внутри экзона гена гемоглобина белковая цепь оказывается укороченной и не обладает активностью;

- мутации в интронах способны генерировать новые сайты сплайсинга, которые, конкурируя с нормальными (исходными), в итоге, заменяют их. Возникновение замен в гене гемоглобина, замедляющих сплайсинг, известно и для β^0-, и для β^+-талассемии.
- мутации в сайтах сплайсинга (на стыках экзонов и интронов), нарушают процессинг первичного РНК-транскрипта и приводят к трансляции бессмысленных белков: удлиненного при неправильном вырезании интронов либо укороченного при вырезании экзонов. Так, в результате одиночных замен в донорском участке сплайсинга гена гемоглобина процессинг нарушается, что приводит к развитию β^0- или β^+-талассемии. А мутация сдвига рамки считывания в акцепторном участке сплайсинга гена *XPA* приводит к полной инактивации белка и, как следствие, к развитию тяжелой формы пигментной ксеродермы.

Замены нуклеотидов в кодирующих областях генов, не сопровождающиеся заменами аминокислот в силу вырожденности генетического кода, приводят к нейтральным мутациям, не оказывающим заметного влияния ни на функцию соответствующего белка, ни на его структуру.

13.2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ГЕННЫХ МУТАЦИЙ

В предыдущем разделе уже говорилось о том, что генные мутации могут представлять собой замены оснований, а также их вставки, перемещения или выпадения.

Различают два типа замен оснований (рис. 13.11):

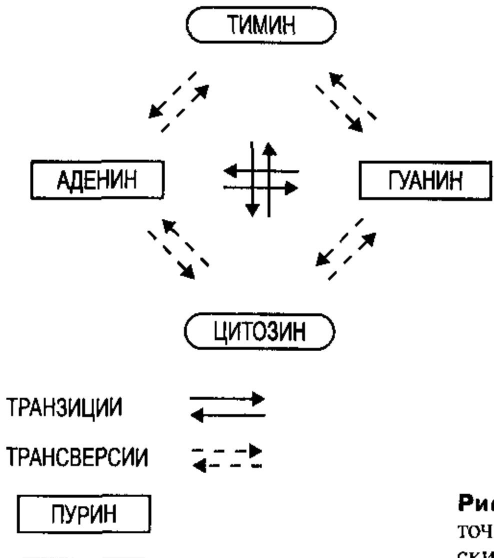


Рис. 13.11. Механизмы возникновения точковых мутаций. (Из: Фогель и Мотульски, 1989)

Рис. 13.12. Таутомерные формы оснований ДНК. (Из: Айала и Кайгер, 1988)

Редкие иминные формы аденина (A*) и цитозина (C*) образуют водородные связи соответственно с цитозином и аденином, а редкие енольные формы гуанина (G*) и тимина (T*) – соответственно с тимином и гуанином.

1) замены пурина на другой пурин или пиримидина на пиримидин. Их называют *транзициями*: A = G, T = C (т.е. такие замены пар нуклеотидов, которые не изменяют ориентации: AT = GC; TA = CG);

2) замены пурина на пиримидин или пиримидина на пурин. Их называют *трансверсиями*: A = T, A = C, G = C, G = T (т.е. такие замены пар нуклеотидов, которые изменяют ориентацию: AT = TA, AT = CG).

Установлено, что спонтанные транзиции могут происходить при репликации ДНК вследствие таутомеризации, изменяющей способность нуклеотидов образовывать водородные связи: аденин приобретает свойства гуанина, гуанин – аденина, цитозин – тимина, тимин – цитозина (рис. 13.12). Участие процесса репликации в мутагенезе было установлено при изучении биологических эффектов аналогов оснований ДНК, например, 5-бромурацила (рис. 13.13), вызывающего мутации у бактериофагов и бактерий.

При включении аналога в ДНК возможна ошибка, состоящая в том, что 5-бромурацил, находясь в редкой енольной форме, спаривается с гуанином, а затем в обыч-

Обычная кетоформа 5-бромурацила (5—BU)   Аденин

Редкая енольная форма 5-бромурацила (5—BU*)   Гуанин

Рис. 13.13. Таутомерные формы 5-бромурацила, аналога тимина. (Из: Айала и Кайгер, 1988)

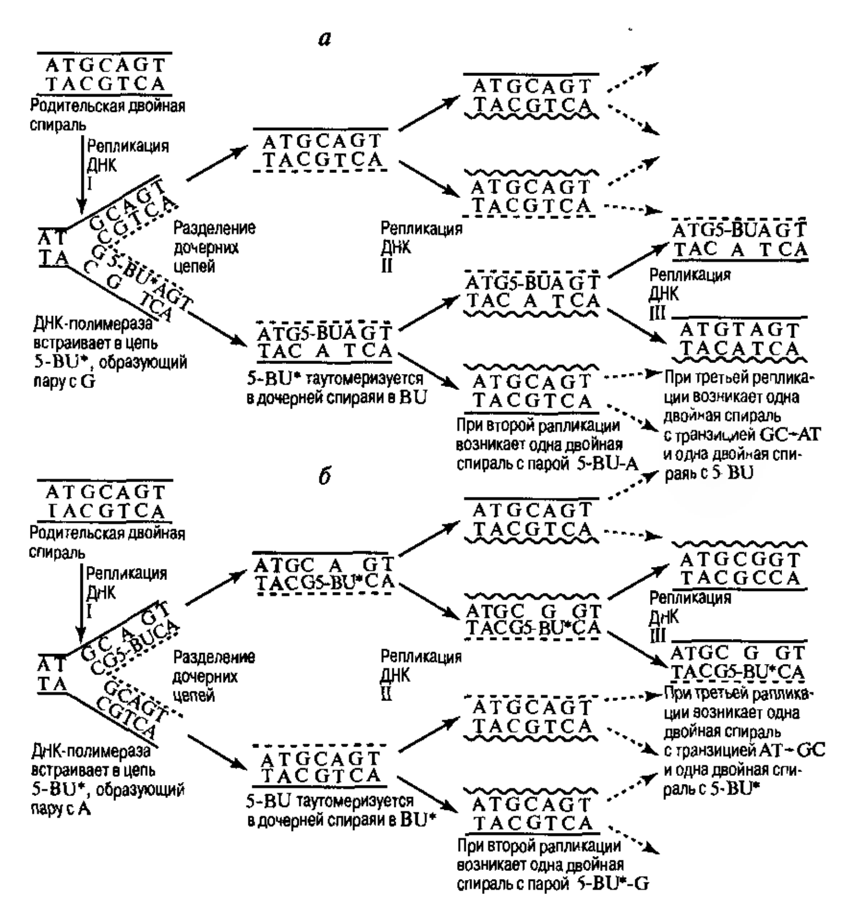


Рис. 13.14. Индукция транзиций 5-бромурацилом при репликации. (Из: Айала и Кайгер, 1988)

а – ошибка включения; б – ошибка считывания

Рис. 13.15. Специфическая реакция гидроксиламина. (Из: Айала и Кайгер, 1988)

ной кетоформе спаривается с аденином; в третьем цикле репликации аденин нормально спаривается с тимином, завершая транзицию GC – AT (рис. 13.14, *а*).

Ошибка при считывании связана с тем, что 5-бромурацил включается при репликации на место тимина, а затем спаривается, находясь в редкой енольной форме, с гуанином; в третьем цикле репликации гуанин нормально спаривается с цитозином, завершая транзицию AT – CG (рис. 13.14, *б*).

Аналогичным образом действует другой аналог оснований ДНК – 2-аминопурин. Транзиции строго в направлении GC – AT можно получить с помощью гидроксиламина, который, специфически реагируя с цитозином, переводит его в форму, способную образовывать водородные связи с аденином (рис. 13.15).

Показано, что аллели генов, контролирующих репликацию (кодирующих ДНК-полимеразу, ДНК-лигазу, ДНК-связывающие белки), проявляют мутаторную или антимутаторную активность, соответственно повышая или понижая частоту мутаций. А соотношение полимеразная/экзонуклеазная активность, как правило, уменьшается в направлении мутатор > дикий тип > антимутатор. Эти результаты согласуются с обнаружением корректирующей 3′-5′-экзонуклеазной активности у всех ДНК-полимераз, в результате которой происходит отщепление ошибочно включенных в ДНК оснований. Следовательно, частота ошибок репликации определяется соотношением полимеразной и экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы.

Что касается молекулярного механизма возникновения вставок, то он, возможно, связан с локальной диссоциацией двойной спирали и последующим ошибочным спариванием нуклеотидов при ее восстановлении.

Несколько особняком стоит класс так называемых **динамических мутаций**, или **мутаций экспансии.** Экспансия (расширение, увеличение) в данном случае – это превышение допустимого числа повторяющихся элементов в микро-/мини-сателлитных последовательностях, локализованных в кодирующих или регуляторных областях гена. Появление мутаций экспансии связано с нестабильностью числа тринуклеотидных повторов в транскрибируемых или регуляторных областях генов. Мутации такого типа зарегистрированы только у человека. Многие из тринуклеотидных повторов в количественном отношении характеризуются высоким уровнем популяционной изменчивости, в пределах которого не наблюдается фенотипических нарушений. Однако если их число превысит определенный критический уровень, развиваются заболевания, для которых характерны: неполное доминирование признака, геном-

ный импринтинг и нарастание тяжести клинических проявлений в последующих поколениях (так называемая *антиципация*). Подробно этот материал освещается в части II. **Медицинская генетика**, поэтому в данной главе ограничимся лишь краткими, предварительными сведениями. Список болезней экспансии, вызванных динамическими мутациями, превысил десяток нозологических форм и продолжает постоянно пополняться. Для части из них (синдром ломкой Х-хромосомы, миотоническая дистрофия) типична передача по материнской линии. Другие, как, например, хорея Гентингтона, передаются преимущественно по отцовской линии. Этиология этих заболеваний связана с экспансией триплетных повторов (CGG)n, (CTG)n, (CAG)n. Практически для всех «болезней экспансии» характерно поражение подкорковых структур головного мозга, причем тяжесть заболевания и его начало положительно коррелируют с числом повторов. Причиной повреждающего действия одних динамических мутаций является утрата функции вследствие блокирования генной экспрессии, других – появление белковых продуктов, аномальная структура которых оказывает повреждающее действие на жизнеспособность или функционирование клеток.

Еще один, класс мутаций – это мутации, возникающие вследствие инсерций (вставок) мобильных генетических элементов (МГЭ). Они описаны в гл. 4. Заметим только, что есть существенное различие между индукцией точковых мутаций и инсерций. При обработке мутагенами частоту точковых мутаций можно увеличить. А результаты перемещения МГЭ от действия мутагенов не зависят.

13.3 ОБРАТНЫЕ МУТАЦИИ И СУПРЕССОРЫ

Мутации гена от состояния «дикого» типа к новому состоянию называют *прямыми*. Многие прямые мутации, возникающие под действием экзогенных факторов разной природы (химической, физической или биологической) способны ревертировать (гл. 14). Это означает, что какая-то другая мутация, восстанавливает исходный «дикий» фенотип мутанта. Такие мутации называют *обратными*, или реверсиями. Еще в 1935 г. Н.В. Тимофеев-Ресовский установил, что для различных генов Х-хромосомы и хромосомы 3 дрозофилы с помощью рентгеновского излучения можно индуцировать обратные мутации от рецессивных аллелей (*eosin, pink, forked*) к нормальным исходным доминантным аллелям.

Восстановление «дикого» фенотипа может произойти за счет истинной обратной мутации в том же сайте, что и прямая мутация. Это приводит к восстановлению исходной последовательности нуклеотидов. Так мутации, индуцируемые обоими названными выше аналогами оснований (5-бромурацил и 2-аминопурин), могут под действием тех же мутагенов ревертировать к дикому типу. Эта способность к реверсии под действием аналогов оснований ДНК, а также азотистой кислоты используется для доказательства транзиционной природы прямых мутаций.

Кроме того, реверсия может произойти, если вторая мутация локализуется в другом месте гена и каким-то образом компенсирует дефект, обусловленный первой му-

тацией. Такова, например, природа обратных мутаций в случае действия акридиновых красителей. Один из них, профлавин, индуцирует мутации не путем замены оснований, а в результате появления в ДНК вставок или делеций. Как известно, одиночная вставка/делеция сдвигают рамку считывания кода в гене, вследствие чего сразу за этим участком искажается считывание исходных кодов для аминокислот синтезируемого белка. Мутантное действие одиночной вставки/делеции может быть компенсировано появлением в непосредственной близости от первичного дефекта делеции (соответственно, вставки). В этом случае код будет искажен только на том небольшом участке, который заключен между точками возникновения первичной и вторичной мутации, что приводит к достаточно быстрому восстановлению исходной структуры ДНК и как следствие – отсутствию серьезных изменений в активности синтезируемого белка. Нормальный фенотип (обусловленный активностью синтезируемого белка) может быть восстанавлен вследствие двойных или тройных точковых мутаций. Последующие мутации в гене, подавляющие первичный мутантный фенотип, получили название *супрессорных* мутаций.

Истинные обратные мутации составляют лишь часть реверсий, в основном осуществляемых за счет супрессии фенотипического проявления одной мутации под действием другой.

В общем виде супрессия может быть:

1) *внутригенной* – когда вторая мутация в уже затронутом гене изменяет дефектный в результате прямой мутации кодон таким образом, что в полипептид встраивается аминокислота, способная восстановить функциональную активность данного белка (что и было рассмотрено выше). При этом данная аминокислота не соответствует исходной (до возникновения первой мутации), т.е. не наблюдается истинной обратимости;

2) *внегенной* – когда изменяется структура тРНК, в результате чего мутантная тРНК включает в синтезируемый полипептид другую аминокислоту вместо кодируемой дефектным триплетом (являющимся результатом прямой мутации). Этот тип супресии был открыт в 1966 г. Чарльзом Яновски в ходе изучения генетического контроля триптофан-синтетазы у *E. coli*. Так в случае *нонсенс*-мутации у серинового кодона UCG в UAG супрессорная мутация в гене тРНК превращала антикодон AGC в AUC, способный прочитывать мутантный кодон UAG. *Миссенс*-мутации в генах белков супрессируются мутантными тРНК путем включения в белок исходной или другой аминокислоты. Так, в случае мутации в глициновом кодоне, вызывающей замену GGA на AGA, в белок включается аргинин. При изменении антикодона CCU в результате супрессорной мутации на UCU тРНК включает вместо аргинина глицин, что приводит к восстановлению структуры и функции нормального белка. Таким образом, изучение супрессорных мутаций позволяет оценить точность процесса трансляции и, в частности, отклонения от кодон-антикодоновых взаимодействий различных элементов белоксинтезирующей системы.

Не исключена компенсация действия мутагенов за счет фенотипической супрессии. Ее можно ожидать, когда на клетку действует фактор, повышающий вероятность ошибок при считывании мРНК во время трансляции (например, некоторые антибиотики). Такие ошибки могут приводить к подстановке неправильной аминокислоты, восстанавливающей, однако, функцию белка, нарушенную в результате прямой мутации.

Определив в общем виде супрессию как полное или частичное восстановление утраченной или нарушенной генетической функции, напомним, что наличие генов, полностью или частично восстанавливающих нормальное развитие особи, измененное в результате мутации, еще в 1920 г. показал А. Стертевант. Так у дрозофилы супрессоры *su(f)* и *su(v)* подавляют действие соответственно генов *forked* (вильчатые щетинки) и *vermillion* (алые глаза), восстанавливая дикий фенотип.

При широком понимании этого явления к феномену супрессии логично отнести и эпистатическое взаимодействие генов.

глава 14

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МУТАГЕНЕЗА

Открытие мутационного процесса в начале XX в. положило начало всестороннему изучению причин и механизмов наследственной изменчивости. Успеху в этом направлении способствовали:

1) выявление мутагенного действия рентгеновских лучей;

2) обнаружение систем, позволяющих отличить мутации в хромосомах от повреждений митотического аппарата или компонентов цитоплазмы;

3) разработка методов количественного учета вновь возникающих мутаций.

В 1925 г. отечественные ученые Г.А. Надсон и Г.С. Филиппов обнаружили повреждающее действие лучей радия на клетки дрожжей. В 1928 г. Г. Мёллер разработал методы количественного учета мутаций у дрозофилы, что позволило ему перейти от констатации мутагенного эффекта рентгеновских лучей к подробному изучению этого феномена.

В связи с тем, что основные закономерности мутационного процесса были открыты при изучении генетических эффектов ионизирующей радиации, в данной главе сначала будет рассмотрен радиационный и химический мутагенез и только потом - спонтанный мутационный процесс.

14.1. МУТАГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ

К ионизирующим излучениям относят электромагнитные рентгеновские, γ- и космические лучи, а также высокоэнергетические α-,β- и др. корпускулярные излучения. Проходя через клетку, они выбивают электроны из внешней оболочки атомов или молекул, превращая их в положительные ионы; освободившиеся электроны продолжают это процесс и выбивают электроны из других атомов и молекул. Атомы, захватившие такие электроны, приобретают отрицательный заряд. Биологическое действие радиации всех типов зависит от локализации источника по отношению к объекту (внутри или вне), типа излучения, энергии излучения и ряда физико-химических свойств поглощающего объекта (рис. 14.1).

Рентгеновские лучи с длиной волны 0,1 -1,0 нм обладают высокой ионизирующей активностью, проникают внутрь живых тканей, причем энергия поглощается непосредственно компонентами клетки, в том числе – молекулами ДНК. Молеку-

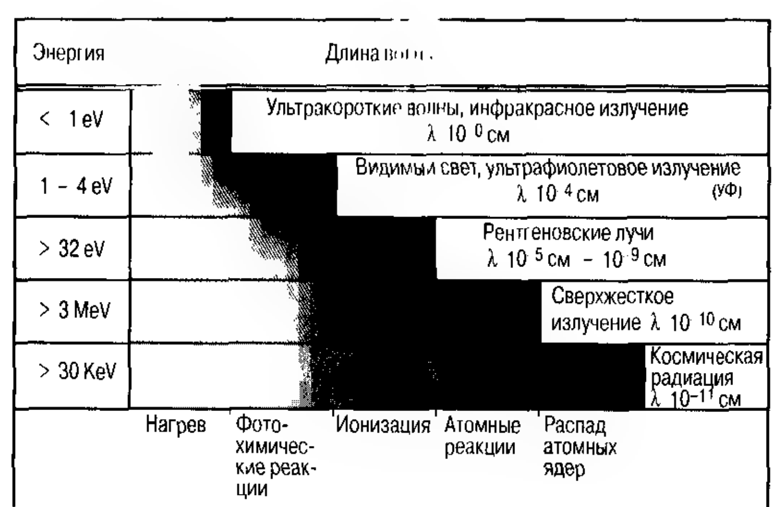


Рис. 14.1. Зависимость биологической активности электромагнитных волн от их длины и энергии. (Из: Фогель и Мотульски, 1989)

лярные механизмы мутагенного действия ионизирующих излучений в общем виде базируются на разнообразных повреждениях нуклеиновых кислот: разрывается углеводно-фосфатный скелет молекулы ДНК, разрушаются основания (особенно пиримидиновые), происходят химические перестройки оснований, изменяющие их способность к спариванию (например, производное пурина спаривается с пурином же, а не с пиримидином). Образуются «сшивки» как в молекулах нуклеиновых кислот, так и между молекулами ДНК и белками. Более подробное описание событий в облученной ДНК следует начать с образования сложного макрорадикала с двумя типами локализации неспаренных электронов: поврежденные основания и сахарофосфатные цепи. Нуклеотиды повреждаются примерно в 3 раза чаще, чем сахарофосфатная часть. Углеродные связи радиоустойчивее, чем фосфодиэфирные в 7,5 раз. Пиримидиновые основания в 2 раза радиочувствительнее пуриновых, причем наиболее радиочувствителен тимин. Чаще повреждается одна цепь ДНК, при этом первичные повреждения (дезаминирование оснований, алкилирование, возникновение оксимов цитозина, димеризация или гидратация пиримидиновых оснований) приводят к вторичным реакциям – разрыву водородных связей, конфигурационным изменениям надмолекулярных структур ДНК и внутри- и межмолекулярным сшивкам полимерных цепей. Разрушение надмолекулярных структур (деспирализация) обусловлено двойными разрывами ДНК, которые возникают, если одиночные разрывы цепей ДНК расположены на расстоянии не более 10 пар нуклеотидов друг от друга.

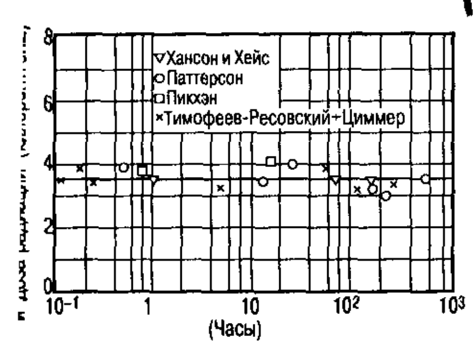
Частота индуцированных генных мутаций пропорциональна дозе облучения. Так, уже в первых экспериментах на дрозофиле при использовании разных доз облучения было установлено, что частота сцепленных с полом рецессивных летальных мутаций находится в линейной зависимости от дозы радиации (рис. 14.2). Кривые доза-эффект характеризуются отсутствием порога и постепен-

Рис. 14.2. Линейное увеличение частоты точковых мутаций у дрозофилы. (Из: Фогель и Мотульски, 1989)

ным нарастанием до насыщения, начиная с самых малых доз. Такой характер кривых отражает не усиление степени поражения с возрастанием дозы, а увеличение вероятности поражения: даже самые малые дозы ионизирующей радиации могут привести к возникновению летальных мутаций и гибели клеток, но лишь у небольшого числа особей.

1 рентген (р) – доза радиации, которая вызывает образование $2{,}1 \times 10^9$ пар ионов, проходя через 1 см^3 сухого воздуха при $t^\circ = 0$ °С и давлении 760 мм рт.ст.	*1 рад* – доза радиации, соответствующая поглощению 100 эргов энергии в 1 г вещества
В обычных условиях их значение очень близко: 1 рад = 1,07 рентгена	

Линейный характер зависимости частоты генных мутаций от дозы указывает, что они образуются одномоментно, т.е. мутацию вызывает один акт ионизации, возникающий адоль пути следования вторичных электронов. В радиобиологии такой акт ионизации называют попаданием. Теория попадания (удара), созданная в 20-х годах XX в., вскоре была модифицирована и легла в основу *теории мишени*, в разработке которой приняли участие как физики, так и биологи. Согласно этой теории, возникновение генных мутаций, мелких делеций и одиночных разрывов хромосом под действием квантов ионизирующей радиации – следствие одиночных попаданий; причем повреждение происходит непосредственно в том месте, где возникает первичная ионизация, а вся реакция протекает внутри определенного объема (мишени), т.е. в самом гене либо в непосредственной близости к нему. В основополагающих исследованиях Д. Ли, М. Демереца, К. Циммера, М. Дельбрюка и Н.В. Тимофеева-Ресовского на разнообразных объектах были изучены радиобиологические эффекты в отношении индуцированных мутаций. В частности, исследования на дрозофиле показали, что частота индуцированных излучением мутаций пропорциональна только общей дозе облучения (рис. 14.3) и не зависит ни от фактора времени, ни от жесткости излучения, определяемой длиной его волны. Однако в дальнейшем эксперимен-

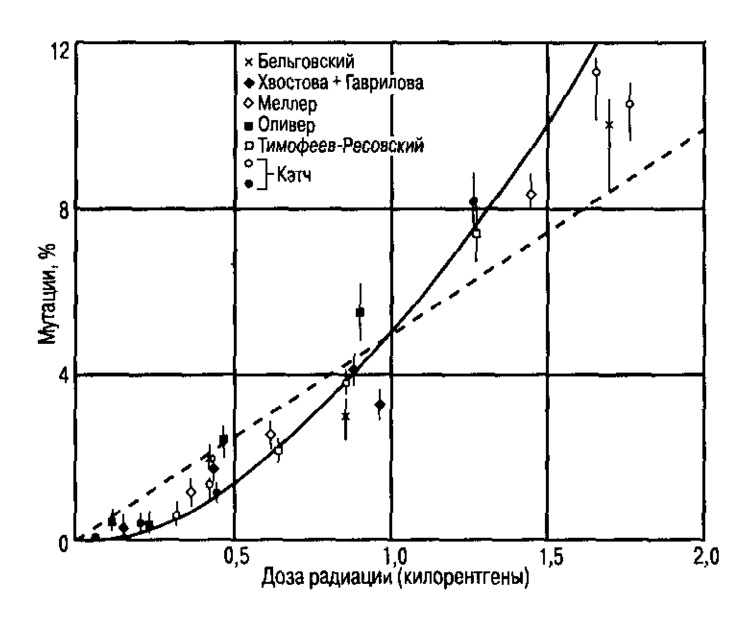


:. 14.3. Результаты облучения дрозо-ы при разных мощностях дозы. (Из: гель и Мотульски, 1989)

ты на мышах заставили исследователей отказаться от категоричных выводов относительно отсутствия зависимости результатов облучения от мощности дозы, т.е. количества радиации, поступающего за единицу времени. Было сформировано представление о том, что определенная доза, использованная при относительно низкой мощности, приведет к меньшему числу мутаций, чем та же доза при более высокой мощности.

Максимальная частота генных мутаций, достигаемая при действии ионизирующих излучений, обычно от нескольких раз до нескольких десятков раз превосходит частоту их спонтанного возкновения. Спектр их остается практически таким же: гены, сравнительно редко гирующие спонтанно, сравнительно редко изменяются и в результате действия ни зирующих излучений и наоборот.

В отличие от генных мутаций частота хромосомных перестроек под действием ни зирующего облучения возрастает примерно пропорционально квадрату дозы іс. 14.4). При этом кривая одного попадания (одноударная кривая) зависимости сла мутаций от дозы облучения меняется на S-образную, обычно полутора-двух-



ис. 14.4. Возникновение хромосомных аберраций – событий с двумя разрывами. (Из: Фогель и Мотульски, 1989)

ударную. Теория мишени объясняет это тем, что указанные виды облучения характеризуются низкой величиной линейного переноса энергии (т.е. плотности создаваемой ими ионизации вдоль треков движения электронов). Поэтому акты ионизации вдоль треков редки, и каждый из них не зависит от другого. Отсюда следует, что один акт ионизации (один удар) достаточен для того, чтобы возникла генная мутация или один разрыв хромосомы, но для двух разрывов хромосомы, ведущих к хромосомным аберрациям, требуются два удара. Поскольку они возникают независимо, вероятность их попадания в одну хромосому является произведением вероятности для каждого из них, что и составляет основу зависимости частоты хромосомных перестроек примерно от квадрата дозы облучения.

По сравнению с γ-лучами медленные нейтроны эффективнее в 5 раз, быстрые нейтроны – в 100, а тяжелые ионы – в 20 раз. В отличие от рентгеновских и γ-лучей, нейтроны и α-частицы, характеризующиеся высоким значением линейного переноса энергии, дают плотную ионизацию в пределах одного трека. Вероятность возникновения двух разрывов хромосомы значительно увеличивается, поэтому кривые зависимости частоты хромосомных аберраций от дозы облучения соответствуют в этом случае кинетике реакций первого порядка.

Дозирование излучения не учитывает фактора времени: одна и та же доза может быть получена при слабой интенсивности облучения в течение длительного времени либо путем кратковременного облучения с высокой интенсивностью. Это верно для генных мутаций и мелких делеций, обязанных своим возникновением единичным актам ионизации, но не вполне справедливо в отношении крупных хромосомных аберраций. Если вся доза дается сразу, то в клетках одновременно присутствуют многочисленные фрагменты, образовавшиеся при разрывах хромосом. Одни из них будут идентифицированы как большие делеции, а другие могут соединяться в новых сочетаниях, что приведет к появлению инверсий и транслокаций. Если же доза дается в несколько приемов, то крупных перестроек будет обнаружено меньше, так как часть ранее возникших разрывов репарируется за время до следующей порции облучения.

Коротко суммировать положения классической теории мишени можно в следующих пунктах:

1) частота возникающих в результате одиночных ударов генных мутаций, микроделеций и хромосомных разрывов линейно зависит от дозы и не зависит от мощности дозы и ее распределения во времени;

2) частота крупных перестроек, возникающих при воссоединении фрагментов в случае двух хромосомных разрывов, возрастает пропорционально квадрату дозы после рентгеновского или γ-облучения и в соответствии с кинетикой первого порядка - после воздействия нейтронами;

3) снижение мощности дозы или ее фракционирование уменьшает частоту хромосомных перестроек в случае рентгеновских лучей и не оказывает влияния на частоту перестроек в случае действия нейтронов.

Теория мишени сыграла значительную роль в развитии радиационной генетики. Но, начиная с ранних экспериментов, накапливались данные о том, что эффект рентгеновского облучения зависит от множества внешних факторов (температура, парциальное давление кислорода, гидратация и присутствие разных химических

ментов в облученной клетке). Теория мишени опиралась на предположение, что мутация возникает сразу под действием одного удара. Однако на самом деле радиационные повреждения генетического материала – не прямые, а лишь потенциальные источники возникновения мутаций. Нельзя отождествлять возникновение мутации с актом попадания, поскольку процесс радиационного мутагенеза связан с метаболизмом поврежденной клетки и может быть модифицирован как в момент облучения, так и после него. Так, например, было показано, что эффективность рентгеновского облучения большинства биологических объектов в атмосфере кислорода в 2–3 раза выше нежели в атмосфере азота или инертного газа. К. Свенсон в 1946 г. выдвинул гипотезу о потенциальных изменениях как предшественниках истинных разрывов, возникающих в хромосомах. Это означает, что часть повреждений возникает в форме предмутаций и в зависимости от условий в клетке может либо реализоваться в мутации, либо элиминироваться с помощью репаративных механизмов. Потенциальный характер повреждений подтверждался в первую очередь фактами модификации радиационного эффекта во время облучения и в пострадиационный период. Было установлено, что подавление метаболизма ведет к более легкому превращению потенциальных изменений в мутации. Так, пострадиационная обработка инфузорий угнетающими синтез ДНК стрептомицином, хлорамфениколом, кофеином, динитрофенолом и низкой температурой снижает выход мутаций. Все потенциальные изменения, не вернувшиеся в исходное состояние до репликации хромосом, в ходе этого процесса превращаются в истинные мутации. Чем дальше отстоит момент облучения от начала синтеза ДНК, тем меньше мутаций возникает при той же дозе облучения.

Различные системы генетической репарации способны восстанавливать структуру ДНК, поврежденную в результате облучения. С репарацией ДНК, например, связан не вполне объяснимый с позиции теории мишени факт, заключающийся в том, что фракционирование дозы рентгеновского облучения уменьшает частоту хромосомных перестроек, но не влияет на таковую для генных мутаций. Очевидно, что полная доза радиации поглощается не сразу, а по мере облучения, так что часть индуцированных разрывов хромосом успевает репарироваться и восстановить целостность нативной структуры ДНК до того, как очередной акт ионизации приведет к возникновению новых одиночных разрывов. Это вызовет уменьшение числа множественных разрывов и, следовательно, снизит вероятность крупных перестроек хромосом. Системы генетической репарации не срабатывают при летальных дозах, являющихся видоспецифичными (для человека летальная доза составляет примерно 500 р, для мыши – 900 р, для дрозофилы – 80 000 р.

В присутствии воды рентгеновские лучи не только прямо воздействуют на чувствительные к ним генетические структуры, но и действуют на них косвенно за счет разложения воды – радиолиза. Этот процесс приводит к образованию реакционноспособных, короткоживущих свободных радикалов водорода H^+ и гидроксила OH^-, объединяющихся с образованием воды, атомарного кислорода либо химически активной перекиси водорода. Поэтому облучение молекул-мишеней в присутствии соединений, способных взаимодействовать со свободными радикалами (антиоксидантов), защищает молекулы-мишени от непрямого действия радиации.

Кроме того, эффективность радиационного мутагенеза, как оказалось, определяется не только дозой облучения и ее мощностью, не только условиями, в которых

клетки или целые организмы подвергались облучению, но и биологической чувствительностью объектов к летальному и мутагенному действию ионизирующих излучений. Так, одна и та же доза рентгеновских лучей индуцирует у мыши примерно в 10 раз больше мутаций, чем у дрозофилы, и почти в 1000 раз больше, чем у бактерий. Следовательно, частоту мутаций необходимо определять с учетом видовых различий организмов.

Кроме того, еще в 50-е годы XX-го века была установлена четкая зависимость частоты возникновения индуцированных мутаций от изменений чувствительности клеток на разных стадиях клеточного цикла. Наибольшей радиочувствительностью обладают клетки на стадии ранней профазы и во время фазы синтеза ДНК.

Наконец, куда именно попадает квант энергии – зависит от случая, но проявляется эффект попадания лишь в определенных участках, так называемых «горячих точках». Это объясняется миграцией энергии или заряда вдоль хромосомы к наиболее легко повреждаемым участкам. Установлена миграция электронного возбуждения по молекуле ДНК на большие расстояния (1 000 – 10 000 п.н.). Если первоначально поражается наиболее радиоустойчивая компонента в сахарофосфате, то, в конечном счете, свободная валентность локализуется на сахарной компоненте. Далее миграция энергии или заряда идет в направлении наиболее возбуждаемых азотистых оснований. Миграция заряда возможна не только внутри ДНК, но и с ДНК на протектор. Профлавин служит лучшим акцептором электронов, и конечное повреждение локализуется именно на нем. Самым плохим акцептором является гистамин, и после γ-облучения сигнал передается от него на азотистые основания. Вещества-радиопротекторы, захватывающие электроны, образуют с ДНК комплекс, в котором возможна миграция заряда на это вещество, а рекомбинация мигрировавшего заряда с зарядом противоположного знака происходит на фрагменте протектора. В итоге произошедших преобразований повреждения могут быть репарированы, могут сформировать точковые мутации или послужить началом цепи событий, приводящих к хромосомным аберрациям.

В заключение отметим наиболее важные характеристики радиационного мутагенеза:

- генетический эффект облучения наблюдается при любой дозе;
- специфика этого эффекта зависит от вида и дозы облучения, состояния репаративной системы ДНК, видоспецифической радиочувствительности, стадии и локализации воздействия.

14.2. МУТАГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫХ ЛУЧЕЙ

В отличие от рентгеновских, ультрафиолетовые (УФ) лучи не действуют на половые клетки большинства многоклеточных организмов, поскольку проникают в ткани очень слабо, не обладают достаточной энергией для индукции ионизации атомов и

ылько возбуждают электронные оболочки. Их мутагенный эффект (возникновение енных мутаций и хромосомных перестроек) обнаруживается лишь в клетках, обра- ующих монослой: микроорганизмах, пыльце и др. УФ-лучи оказались первым му- геном, чье действие на бактериальные клетки было подробно изучено. О том, что ьтрафиолетовое излучение убивает бактерии, известно с 1877 г., а в 1914 г. была вы- влена способность УФ-лучей индуцировать у бактерий наследуемые варианты, от- ичающиеся от исходного типа по патогенности и морфологии колоний. Но лишь эидцать лет спустя М. Демерец показал, что среди клеток чувствительного к фагу I штамма *E. coli*, выживших после облучения определенной дозой ультрафиолета, оля мутантов превышает их спонтанный уровень среди необлученных бактерий бо- ее, чем в тысячу раз.

Ключевые исследования, позволившие установить механизм действия ультрафи- лета, были начаты в 1946 г. на *E. coli* Эвелин Виткин. Она показала, что мутагенный фект УФ-лучей в большинстве случаев носит всего лишь потенциальный характер вероятность появления индуцированных мутаций в значительной степени зависит того, в каких физиологических условиях находится клетка после облучения. Э. иткин предположила, что клетка имеет механизм, способствующий восстановле- ию от повреждающего действия ультрафиолета. Дальнейшие исследования показа- и правильность ее предположения.

В отличие от рентгеновских лучей, мутагенность которых не зависит от длины волны, епень мутагенности УФ-лучей является функцией последней. Максимум поглощения Ф-облучения входящими в состав ДНК пуринами и пиримидинами лежит в области 0 нм. Эта же величина соответствует максимуму мутагенности УФ-лучей, что указыва- на прямую связь процесса индукции предмутационных повреждений ДНК с поглоще- ием УФ-лучей ее азотистыми основаниями. Основные фотопродукты, возникающие и облучении двухцепочечной ДНК - пиримидин-пиримидиновые (преимущественно мин-тиминовые) димеры, формирующие между соседними основаниями в цепи ДНК иклобутановые кольца. УФ-лучи вызывают не только образование димеров, но и их зрушение. Когда димеризация оснований в ДНК при воздействии лучей с длиной вол- ы 240 нм достигает примерно 15%, начинается расщепление димеров; процессы обра- вания и расщепления димеров приходят в равновесие, характеризующееся насыщени- , при котором дальнейшее увеличение дозы УФ не приводит к росту числа димеров в НК. Для каждой длины волны характерно определенное равновесие между образова- ием и разрушением димеров. Так, например, доля димеров при длине волны 280 нм со- авляет 70%. Установлено, что частота появления димеров зависит, помимо длины вол- ы УФ-лучей, от температуры и pH среды (максимальная – при 23 °С и pH= 8).

Присутствие димеров в ДНК приводит к ошибкам при ее репликации. Механизм пре зания УФ-индуцированных повреждений ДНК, работающих на свету (фоторе- тивация), рассмотрен нами в гл. 10. Добавим, что исследования актиномицетов зволили установить временны́е характеристики формирования мутаций после здействия УФ-света. Оказалось, что мутагенный эффект тем выше, чем больше омежуток времени между облучением клеток ультрафиолетом и последующей их работкой видимым светом. Так, интервал между 98%-ным восстановлением от по- еждений и временем получения максимального числа мутаций составлял 7 ч, а не- осредственно в момент своего действия УФ-свет вызывал появление не истинных

мутаций, а первичных пиримидин-пиримидиновых димеров, которые эффективно репарировались при включении видимого света сразу после обработки ультрафиолетом.

Таким образом, для перехода образовавшихся димеров в истинные мутации требуется некоторое время, в течение которого происходят определенные химические изменения в молекулярной структуре ДНК. Кроме того, было установлено, что характерной особенностью мутагенеза при воздействии УФ-света на клетки является необходимость синтеза в них белков. Максимальный выход мутаций наблюдается, когда облучение производится в момент максимально близкий к S-фазе. Ингибирование синтеза ДНК после УФ-облучения снижает выход мутаций на 90%.

Кроме прямого действия на ДНК, УФ-лучи индуцируют мутации и косвенно, вызывая образование в клетках свободных радикалов и перекисей, обладающих мутагенными свойствами. Такие же мутагенные вещества возникают под действием УФ-света в жидких питательных средах для культивирования бактерий, что заметно увеличивает у них частоту мутаций.

14.3. МУТАГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Широкое изучение химического мутагенеза началось после того, как в 1942 г. Шарлотта Ауэрбах и Дж. Робсон обнаружили в опытах на дрозофиле мощное мутагенное действие иприта и его производных. В 1946 г. отечественный генетик И.А. Рапопорт выявил такие же свойства у этиленимина и формальдегида. С тех пор было обнаружено множество химических соединений, способных вызывать в ДНК разного рода нарушения:

1) ковалентные сшивки двух близко расположенных оснований;

2) ковалентное связывание азотистых оснований с алифатическими и ароматическими радикалами;

3) химические перестройки азотистых оснований (дезаминирование, нарушение кольцевой структуры, полная элиминация);

4) нарушение сахарофосфатного каркаса полинуклеотида.

В соответствии со спецификой мутагенной активности среди химических агентов можно выделить:

1) соединения, мутагенные в отношении как реплицирующейся, так и не реплицирующейся ДНК (алкилирующие соединения, окислители-восстановители);

2) соединения, мутагенные только в отношении реплицирующейся ДНК (производные пуринов и пиримидинов, акридиновые красители);

3) прочие химические, в том числе биогенные мутагены (экзогенная ДНК, вирусы, бактериофаги и др.).

Алкилирующие агенты, представляющие собой наиболее обширную группу химических мутагенов – это химические соединения, которые переносят алкильные

$CH_3-S(=O)_2-O-CH_3$

Алкилирование гуанозина в 7-й позиции с последующим таутомерным сдвигом (внизу справа)

с. 14.5. Действие алкилирующего агента – метилметансульфоната. (Из: Фогель и Моьски, 1989)

илирование гуанозина в 7-м положении с последующим таутомерным сдвигом.

,пны на биологические макромолекулы. Они являются источниками для введея в молекулы реагирующих с ними веществ радикалов (алкильных групп): метила H_3), этила (C_2H_5), пропила (C_3H_7) и т.д. В общем виде процесс алкилирования, т.е. мещения атома водорода в молекуле алкильной группой, можно представить форлой X – H → X – R. К алкилирующим агентам относятся несколько гетерогенных ассов химических соединений: этиленимины, алкилалкансульфонаты, эпоксиды, югоатомные спирты, производные нитрозомочевины и аминоимидазола и некорые другие природные и синтезированные химические соединения. Среди алкирующих агентов, непосредственно взаимодействующих с ДНК, – серный и азотий иприты, β-пропиолактон, алкилсульфонаты, алкилнитрозамины и др. Фактиски все потенциально нуклеофильные группы азотистых оснований реакционно тивны в отношении метилирующих и этилирующих агентов. Возможные участки мещения в ДНК представляют собой: у аденина – атом азота в 1-м, 3-м и 7-м пожении (N-1, N-3, N-7), у гуанина – в тех же трех положениях, у цитозина – атом эта в N-1 и N-3, а у тимина – в N-3. Таким образом, алкилируются преимущественно свободные атомы азота, которые не включены в формирование водородных язей, расположены близко к фосфатной группе и находятся на внешней стороне в крученной двуспиральной ДНК. Основной участок реакции (на его долю может иходиться до 90% общего алкилирования) для многих из перечисленных агентов – эм азота в 7-м положении гуанина (рис. 14.5). Такое взаимодействие ведет к ослаблению связи между алкилированным азотистым основанием и сахарофосфатным осном и выпадению пурина из алкилированной ДНК (возникает апуриновая сть). На место выпавшего пурина в образовавшийся апуриновый сайт может гроиться какое-либо другое основание, что ведет к возникновению транзиций ;C – AT) – основного типа изменений, лежащих в основе мутаций под действием килирующих агентов. Кроме того, в результате ошибок генетической репарации

могут возникать мутации типа транзиций AT — GC, трансверсий и сдвига рамки считывания.

Появляющиеся в результате алкилирования модифицированные азотистые основания могут быть как химически нестабильными, так и стабильными. В первом случае они подвергаются неферментативному гидролизу с образованием апуриновых и апиримидиновых участков. Во втором случае модифицированные основания могут быть удалены N-гликозилазами, что также приводит к образованию апуриновых и апиримидиновых участков, которые в дальнейшем репарируются по эксцизионному типу (гл. 10). Оставшиеся нерепарированными стабильные модифицированные азотистые основания обусловливают ошибки считывания генетической информации в ходе репликации и транскрипции.

Алкилирующие соединения вызывают также поперечные сшивки цепей в молекуле ДНК, приводящие к разрывам хромосом и появлению хромосомных аберраций. По скорости алкилирования ДНК различают быстро реагирующие сшивающие агенты (например, иприты) и медленно, пролонгированно реагирующие (например, тиофосфамид), при действии которых количество сшивок нарастает с течением времени. Репарация таких тяжелых повреждений ДНК, как внутри- и межмолекулярные сшивки, ингибирующие ее синтез и транскрипцию, также происходит по эксцизионному типу.

Кроме того, под действием алкилирующих соединений могут образовываться сшивки ДНК-белок, причем двух типов: сшивки белка с одной молекулой ДНК и соединение двух молекул ДНК с помощью белкового мостика. Помимо названных, не исключена возможность образования в хроматине мостиков белок-белок, затрудняющих контакт ДНК-полимеразы с матрицей. Уменьшение числа сшивок ДНК–белок при длительном инкубировании клеток после воздействия сшивающих алкилирующих агентов показано на многих объектах, но механизм их репарации не изучен.

Из числа алкилирующих соединений особо выделяется группа так называемых супермутагенов: нитрозометил-/нитрозоэтилмочевина, диэтилнитрозомочевина, этилметансульфонат, 1,4-бис-диазоацетилбутан и некоторые другие вещества, проявляющие особенно высокую мутагенную активность. Кроме того, многие алкилирующие соединения обладают также канцерогенными свойствами, вызывая возникновение злокачественных опухолей, и оказывают тератогенные эффекты.

Окисление органических молекул сопровождается потерей ими атома водорода, который при присоединении к другим молекулам вызывает их восстановление. Типичный представитель мутагенов окислительно-восстановительного типа — азотистая кислота (рис. 14.6), действующая путем окислительного дезаминирования оснований, в состав которых входят аминогруппы (гуанин, аденин, цитозин). Дезаминирование цитозина превращает его в урацил, спаривающийся с аденином (мутация замены пар оснований GC – AT). Дезаминирование гуанина переводит его в ксантин, однако, это не нарушает специфичности спаривания, так как оба они образуют водородные связи с цитозином. Замещение аминогруппы кетогруппой превращает аденин в гипоксантин, который спаривается преимущественно не с тимином, а с цитозином (мутация замены пар оснований типа AT – GC).

Поскольку азотистая кислота индуцирует транзиции в обоих направлениях, вызываемые ею мутации, как уже было сказано выше, способны ревертировать при по-

Цитозин — HNO₂ → Урацил · Аденин   GC → AT

Аденин — HNO₂ → Гипоксантин · Цитозин   AT → GC

:. 14.6. Действие азотистой кислоты. (Из: Айала и Кайгер, 1988)

эной обработке тем же мутагеном. Помимо замен оснований азотистая кислота уцирует делеции, что обусловлено ее способностью к поперечному сшиванию екул ДНК и нарушению закономерностей репликации.

Аналоги оснований, механизм мутагенного действия которых уже частично рас-тривался нами – это соединения, имеющие кольцевую структуру, сходную с чными для ДНК азотистыми основаниями, но отличающиеся от них по химиче-м свойствам (5-бромурацил, 5-бромдезоксиуридин, 5-фтордезоксиуридин, 8-уанин, 2-аминопурин, кофеин и др.). Прямой механизм мутагенного действия логов оснований связан с их более выраженной по сравнению с нормальными ованиями способностью к таутомерным переходам: из нормальной кетоформы в кую енольную форму (у пиримидинов) и из нормальной аминоформы в редкую иноформу (у пуринов). Находясь в аминоформе, 2-аминопурин, подобно адени-:париваетcя с тимином, а в иминоформе – с цитозином (рис. 14.7). Это приводит явлению транзиций GC – AT либо AT – GC. Кроме прямого действия, аналоги ований могут увеличивать чувствительность молекул к другим мутагенам (так 5-

2-аминопурин (аминоформа) · Тимин   2-аминопурин (иминоформа) · Цитозин

:. 14.7. Действие 2-аминопурина – аналога аденина. (Из: Айала и Кайгер, 1988)

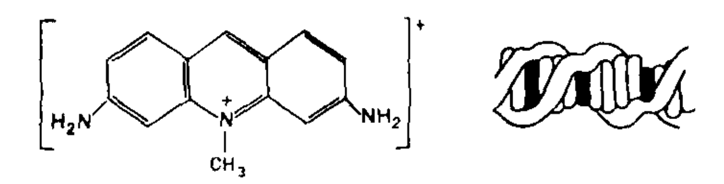


Рис. 14.8. *Действие акридинового красителя трипафлавина.* (Из: Фогель и Мотульски, 1989)

При встраивании молекулы трипафлавина в ДНК транскрибируемая цепь растягивается, что приводит к сдвигу рамки считывания.

бромурацил делает ДНК более чувствительной к ультрафиолетовым лучам и ионизирующим излучениям).

Акридиновые красители (акридин оранжевый, профлавин и др.) индуцируют мутации типа сдвига рамки считывания. Они внедряются между соседними основаниями в ДНК, молекула ДНК растягивается на длину одного нуклеотида, и при последующей репликации напротив внедрившейся молекулы красителя встраивается дополнительный дезоксирибонуклеотид. Один из путей возникновения таких мутаций представлен на рис. 14.8. Другая возможность индукции мутаций типа сдвига рамки считывания связана со встраиванием акридина между основаниями с дальнейшими ошибками синтеза ДНК при рекомбинации и генетической репарации.

Довольно близкими к химическим мутагенам, но значительно превосходящими их по специфичности действия являются экзогенные ДНК, а также препараты вирусов и бактериофагов. Мутагенное действие ДНК открыл в 1939 г. С.М. Гершензон. Введение в организм дрозофилы препаратов ДНК, выделенных из разнообразных живых организмов, приводило к формированию множества видимых и летальных перестроек, представленных исключительно генными мутациями и микроделециям (крупные перестройки хромосом практически отсутствовали). При этом виде мутагенеза отмечается высокая локусоспецифичность (частота мутаций некоторых генов возрастает на 2-3 порядка), и поэтому спектр индуцируемых действием ДНК мутаций сильно отличается от того, который характерен для воздействия другими мутагенами, а также для факторов спонтанного мутагенеза. Наконец, мутагенному действию ДНК присущ чрезвычайно пролонгированный эффект, не описанный для других мутагенов. Мутации индуцировались не только в потомстве подвергавшихся воздействию чужеродной ДНК дрозофил, но и в нескольких последующих поколениях. Установлено, что мутагенными свойствами обладают некоторые искусственно синтезированные полинуклеотиды, причем характер их действия подобен таковому у природной ДНК.

Суммируя представленные данные, отметим основные особенности химического мутагенеза:

1) зависимость от дозы и продолжительности обработки;

2) более высокая частота генных мутаций по сравнению с хромосомными перестройками;

3) задержанный мутагенез (проявление мутации через ряд клеточных поколений);

региональная специфичность при действии на хромосомном уровне (бо́льшая ҝаемость гетерохроматина);

специфичность действия на уровне генов (одни гены мутируют чаще других);

неаддитивность эффекта при комбинированном воздействии разными мутаге-

,

канцерогенность и тератогенность большинства химических мутагенов

14.4. СПОНТАННЫЙ МУТАЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС

панный мутагенез, т.е. процесс возникновения мутаций в организме в отсутст- намеренного воздействия мутагенами, представляет собой конечный результат арного воздействия различных факторов, приводящих к повреждениям генети- их структур в процессе жизнедеятельности организма.

14.4.1. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА СПОНТАННЫЙ МУТАЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС

ти факторы можно разделить на:

кзогенные (естественная радиация, экстремальные температуры и др.);

ндогенные (спонтанно возникающие в организме химические соединения-мета- олиты, вызывающие мутагенный эффект; ошибки репликации, репарации, ре- омбинации; действие генов-мутаторов и антимутаторов; транспозиция мобиль- ных генетических элементов и др.).

)рганизм человека за год поглощает в среднем 0,095 рад энергии ионизирующих чений, поступающих от естественной радиации (γ-излучение Земли, космиче- : лучи, радиоактивные элементы земной коры и атмосферы такие, как радон, уг- од C^{14}, калий K^{40} и др.). Эта доза зависит от высоты над уровнем моря и геогра- еской широты. Кроме того, радиация выше в районах, где есть выходы на рхность первичных пород. У человека доля мутаций, индуцированных естественной иацией составляет до 25%, а у дрозофилы – лишь 0,1% всех спонтанных мутаций.

Относительно УФ-излучения выше уже было указано, что оно практически не иг- никакой роли в возникновении мутаций в половых клетках эукариот, не обла- достаточной проникающей способностью. В то же время, у одноклеточных орга- мов и вирусов под действием ультрафиолета образуется значительная часть спон- ных мутаций.

Замечено, что в высокогорных, а также арктических условиях растительность дставлена преимущественно полиплоидными формами, так как резкие перепады нператур в период вегетации растений ведут к увеличению частоты спонтанных ге- нных мутаций. Увеличение температуры окружающей среды на каждые 10 °С уве- ивает частоту мутаций в 5 раз.

Основным источником спонтанных мутаций служат эндогенные факторы, приводящие к повреждению генов и хромосом в процессе нормального клеточного метаболизма. Результат их действия – ошибки генетических процессов репликации, репарации и рекомбинации.

Ошибки репликации:

- таутомерные переходы азотистых оснований приводят при репликации к спонтанным транзициям и трансверсиям;
- ошибки в работе ДНК-полимераз обусловливают некомплементарное встраивание 1 на 100000 вновь синтезирующихся нуклеотидов. Корректорская 3′-5′-экзонуклеазная активность ДНК-полимераз снижает эту частоту до 1 на 10 000 000 000;
- химические модификации оснований (например, при встраивании 5-метилцитозина происходит замена GC – AT, т.к. 5-метилцитозин при последующей репликации может образовывать водородные связи с аденином).

Ошибки репарации:

- например, мутации в гене *uvrD*, отвечающем за репарацию одноцепочечных разрывов при УФ-облучении *E.coli*, в сотни раз повышает частоту спонтанных транзиций AT – GC.

Ошибки рекомбинации:

- в результате неравного внутригенного кроссинговера в мейозе происходят вставки либо выпадения оснований.

К эндогенным факторам спонтанного мутагенеза относится и мутагенная активность специальных элементов генома: генов-мутаторов и эндогенных метаболитов. Так генетическая стабильность большинства генов определяется не только особенностями их строения, но и уровнем общей мутабильности клетки, контролируемой генами-мутаторами и антимутаторами, которые по-видимому, задействованы в процессах репликации, репарации и рекомбинации ДНК. К классу эндогенных метаболитов относятся спонтанно возникающие химические соединения, вызывающие мутагенный эффект. Например, при заживлении физических травм у растений, образуются каллусные клетки, которые в норме отсутствуют, при этом индуцируется синтез дополнительных ферментов и метаболитов, необходимых для заживления раны. Если в каллусной ткани возникают почки, то часть побегов из этих почек оказываются полиплоидными, т.е. метаболиты каллусной ткани способны вызывать геномные мутации. Мутагенным эффектом обладают и свободные радикалы, возникающие при перекисном окислении липидов клеточных мембран.

Среди структурных факторов, определяющих эндогенные механизмы мутагенеза, можно выделить такие:

- наличие прямых и обратных повторов вблизи места перестройки;
- высокая концентрация CpG-динуклеотидов;
- наличие внегенных последовательностей ДНК, гомологичных фрагментам структурного гена;
- мобильные элементы генома.

Два первых фактора реализуются в процессе репликации ДНК хромосом, третий – в процессе рекомбинации.

Вследствие скользящего нарушения спаривания (*slipping mispairing*) родительской и дочерней цепей ДНК при репликации нередко образуются петли. Их формирование обусловлено наличием в первичной структуре ДНК прямых и инвертированных повторов, идентичных повторяющихся последовательностей, структур шпилечного типа, квазипалиндромных последовательностей и симметричных элементов генома (например, CTGAAGTC). Эти петли либо исчезают в результате репарационного процесса (и тогда возникают делеции), либо сохраняются и приводят к дупликациям и инсерциям; при этом сформировавшиеся изменения закрепляются в последующих циклах репликации. Именно в последнем случае возможно появление *мутаций экспансии*.

Возникновение мутаций зависит от особенностей первичной структуры ДНК в месте перестройки, и ряд исследователей полагают, что повышенной эндогенной мутагенностью обладают вообще все последовательности ДНК, находящиеся в состоянии изгиба (*bent DNA)*. Именно такая конформационная структура ДНК свойственна: промоторным частям генов, местам начала репликации (*origins of replication*), местам контакта хромосом с ядерным матриксом, т.е. тем участкам ДНК, на которые воздействуют топоизомеразы, участвующие в процессах репликации, транскрипции, рекомбинации, в том числе, и негомологичной (незаконной). Результатом последней могут быть не только внутригенные мутации, но и крупные структурные перестройки хромосом (транслокации, инверсии и др.).

Наиболее распространенные спонтанные нарушения ДНК в ходе репликации и репарации – потеря оснований и дезаминирование, к которому особенно чувствительны цитозиновые остатки. В настоящее время показано, что у позвоночных почти половина всех цитозиновых остатков в ДНК метилирована в 5-м положении, в областях повторов 5′-CpG-3′. При дезаминировании 5-метилцитозин превращается в тимин. При последующей репликации возникший в результате дезаминирования ошибочный вариант (T-G) либо корректируется (C-G), либо приводит к мутациям типа транзиций: (T-G) или (C-A). Гены, имеющие в своей структуре большой процент CpG-оснований, спонтанно мутируют по типу транзиций особенно часто. Таковы, например, ген фенилаланингидроксилазы у больных фенилкетонурией, гены факторов VIII и IX свертывания крови и др.

Еще одна существенная причина эндогенного мутагенеза – наличие псевдогенов – тесно сцепленных с генами гомологичных последовательностей ДНК. В мейозе результатом такой структурной особенности может быть неравная гомологичная рекомбинация и, как следствие – генная конверсия, сопровождающаяся делециями, дупликациями и другими перестройками. Так, очевидная ключевая роль ошибок рекомбинации в этиологии нарушений структуры была установлена при анализе гигантского по размерам (2,2 млн. п.н.) гена дистрофина, мутации которого (в 60% случаев являющиеся делециями) ведут к миопатии Дюшенна. Подавляющее большинство этих делеций, захватывающих один или несколько соседних экзонов, сосредоточено в двух «горячих» районах. Наблюдаемая частота внутригенных рекомбинаций почти в 4 раза выше, чем можно предполагать, исходя из размеров гена дистрофина. В одной из этих «горячих» точек (интрон 7) недавно обнаружен кластер транспозоноподобных повторяющихся последовательностей. Единичные пока наблюдения свидетельствуют о реальном перемещении этих элементов по типу конверсии и об их интеграции в структурные гены аденозиндезаминазы, аполипопротеина С, факторов VIII и IX свертывания крови, кальмодулина.

пы генных, хромосомных и геномных мутаций. Какой-либо направленности в ектре спонтанных мутаций не обнаруживается. Средний темп спонтанного мутаионного процесса довольно постоянен и составляет для генных мутаций в половых летках величину порядка: 1 мутация в одном гене на 104 - 106 гамет за одно поколеие. Этот показатель колеблется в связи с вариацией в уровнях экзо- и эндогенных акторов мутагенеза.

Изучение темпа спонтанного мутирования у человека задача весьма непростая, ак как для оценки интенсивности процесса необходимо иметь данные о частоте мунтов. Между тем у человека учету поддаются не все вновь возникшие мутации, а в сновном те, что проявляются в постнатальном периоде. К ним удается добавить неольшую часть мутаций, дающих клинические проявления в позднем эмбриональом периоде развития. Но и точность учета мутантов в постнатальном периоде не полне удовлетворительна по целому ряду причин. Среди них и организационные рудности исследования, связанные с возможно недостаточной точностью диагнотики исследуемых случаев и неидеальным состоянием архивов медицинских учреждений, и собственно проблемы методологии. Тем не менее, имеются данные по частоте генных мутаций, обусловливающих наиболее четко диагностируемые наследтвенные болезни. Приводя их в своей монографии 1998 г. Н.П. Бочков и А.Н. Чебоцрев отмечают значительную сложность интерпретации. Так, неясно, действительо ли столь сильно различаются частоты мутаций, возникших в разных локусах (количество мутантов на 10^6 гамет при синдроме Хиппеля–Линдау и нейрофиброматозе оставляет 0,18 и 44,0-100,0 соответственно). Во-первых, из-за не слишком большого азмера выборок в колебаниях частот возможен элемент случайности. Во-вторых, слеует учитывать наличие возможности сходных фенотипических проявлений мутаций в азных локусах (приводящих к так называемой генетической гетерогенности наследственных заболеваний). Наконец, вследствие возможных резких различий в фенотипических проявлениях серии множественных аллелей не исключено, что частоты мутаий одного и того же локуса не суммируются, искажая тем самым истинную картину. ем не менее, современные данные позволяют предполагать, что частота спонтанных енных мутаций у человека колеблется в тех же пределах, что и у лабораторных животых.

Если средняя частота спонтанного возникновения генных мутаций у человека аходится в пределах от 10^{-5} до 10^{-7} на одну гамету за каждое поколение, то для наиолее устойчивых частей генома она составляет величину, равную 10^{-11}, а для высоомутабильных локусов — 10^{-4}, т.е. существуют «горячие» точки мутационного процесса.

Как высокомутабильные проявляют себя, прежде всего, те участки генома, изменчивость которых, будучи обусловлена нестабильностью в числе тандемных повторов, носит нейтральный характер, а темп мутирования не подвержен жесткому онтролю со стороны естественного отбора. Такими особенностями отличаются TR-сайты (от англ. *short tandem repeats*), представляющие собой короткие тримерые и тетрамерные тандемные повторы. Частота возникновения спонтанных мутаий в них варьирует в пределах от 0,1 до 0,45% на гамету, а в наиболее вариабельных TR-локусах может достигать 5% на гамету за поколение. У ряда варьирующих по ислу тандемных повторов — VNTR-локусов (*MSB2*) частота мутирования достигает

14.4.2. УЧЁТ СПОНТАННЫХ МУТАЦИЙ У ЧЕЛОВЕКА

Для оценки частоты возникновения мутаций (скорости мутирования) у человека, необходим подсчет числа так называемых спорадических случаев мутации, когда какой-либо признак или наследственная болезнь возникают у данного индивида *de novo*, т.е. их нет ни у его родителей, ни у других членов семьи. В 1967 г. Курт Браун предложил определять частоту мутаций на популяционной выборке новорожденных по формуле:

$$\frac{\text{Число спорадических случаев проявления данной аномалии}}{2 \times \text{Число обследованных индивидов}}$$

Наличие коэффициента 2 обусловлено тем, что мутация может возникнуть как в отцовской, так и в материнской хромосоме. Кроме того, в качестве необходимого условия принимается, что все спорадические случаи рождения носителей рассматриваемого признака обусловлены мутациями *de novo*, характеризующимися полной пенетрантностью, и не являются фенокопиями.

Для выполнения этих условий необходим анализ многих родословных, причем не содержащих пропусков признака в поколениях. Кроме того, не всегда удается получить данные, свидетельствующие о моногенном характере наследования изучаемого мутантного признака.

Когда оценка основана на данных о новорожденных, ее следует считать заниженной, т.к. учтены лишь те мутации, носители которых выживают к моменту рождения. У человека же, равно как и у других млекопитающих, преобладающее большинство геномных и хромосомных мутаций летальны и обусловливают гибель зиготы. Частоты такого типа мутаций оказываются выше при обсчете данных амниоцентеза, проведенного на 16–17 неделе беременности.

Этот, так называемый, прямой метод используется в работах по геномным мутациям и структурным аберрациям хромосом, его можно применять и в отношении доминантных генных мутаций. Однако, прямой метод совершенно неприменим в случае рецессивных мутаций, так как они чаще всего возникают в половых клетках индивидов, состоящих в браке с гомозиготными носителями нормального аллеля. Часть их потомков окажутся гомозиготными по нормальному аллелю, а часть гетерозиготными, т.е. будут нести и нормальный, и мутантный аллель. Но надежных методов для выявления гетерозигот по различным патологическим генам, к сожалению, пока нет. Подробно частоты спонтанных мутаций, сопряженные с конкретными наследственными заболеваниями, и методы их оценки рассмотрены в соответствующих разделах части II. **Медицинская генетика**.

14.4.3. ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ СПОНТАННОГО МУТАЦИОННОГО ПРОЦЕССА

Спонтанный мутационный процесс постоянно протекает у всех живых организмов, как в половых клетках, так и в соматических. При этом возникают все возможные

0,7% на гамету. А для некоторых VNTR-локусов (*M17*) обнаружено достоверное превышение скорости мутагенеза в зародышевых клетках по сравнению с соматическими.

В смысловых и регуляторных последовательностях ДНК подобные тандемные повторы относительно редки и увеличение их числа, связанное с мутациями экспансии, приводит к тяжелым заболеваниям (например, в случае хореи Гентингтона, некоторых типов спинально-мозжечковой атаксии; миотонической дистрофии). Механизм защиты от подобных мутаций заключается в существовании большого числа аллелей дикого типа, отличающихся друг от друга небольшим числом копий, и значительном различии по длине повторяющегося участка между нормальными и мутантными вариантами гена.

Темпы мутирования в кодирующих областях генома и микросателлитных последовательностях ДНК различны вследствие разных физических основ изменчивости и зависят от характера мутационного повреждения, механизмов возникновения мутаций, локализации нарушения, структуры, протяженности и функции самого гена. Для многих структурных генов доминирующими по спектру и частоте являются точковые мутации, тогда как для других – достаточно протяженные структурные перестройки, типа делеций, дупликаций и инсерций. Наиболее распространенные наследственные болезни, в основном обусловлены точковыми мутациями и делециями. Частота, тип и локализация этих мутаций зависят от эндогенных механизмов мутагенеза, большинство из которых полностью не изучены.

14.4.4. ЗАКОН ГОМОЛОГИЧЕСКИХ РЯДОВ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ

С процессами спонтанного мутагенеза связаны проявления наследственной изменчивости у разных систематических групп организмов. Изучая эту проблему, на примере вариации форм культурных растений и их диких сородичей со всех континентов земного шара, Николай Иванович Вавилов сформулировал **закон гомологических рядов наследственной изменчивости.** В основе закона лежит представление об однотипном изменении генов у генетически родственных форм, в результате чего появляются сходные мутации. При этом:

1) виды и роды, генетически близкие, характеризуются сходными рядами наследственной изменчивости с такой правильностью, что, зная ряд форм в пределах одного вида, можно предвидеть параллельные формы у других видов и родов. Чем генетически ближе расположены в общей системе роды и виды, тем полнее сходство в рядах их изменчивости;

2) целые семейства растений, в общем, характеризуются определенным циклом изменчивости, проходящей через все роды и виды, составляющие семейство.

Таким образом, в свете сформулированного закона, случайные по своей направленности мутации у каждой отдельной особи представляют собой закономерное явление, если рассматривать их с позиций вида, так как спектр этих мутаций у каждого вида предопределен исторически сложившимся генотипом. Как всякий закон он позволяет предсказывать еще не наблюдавшиеся факты и явления, в данном случае – су-

:твование определенных форм у еще ие исследованного вида, на основе данных изученному, близко родственному в генетическом отношении виду. Сам Н.И. Ва-ов, обнаружив мутантную (без лигулы) по строению листа форму мягкой пшени-предположил возможность существования таких же форм у других злаков. Дей-ительно, были найдены кукуруза, овес, просо, ячмень, а также мятлик и пырей с логичной мутацией.

Закон гомологических рядов наследственной изменчивости был восторженно ечен современниками, которые услышали его в докладе Н.И. Вавилова на 3-м российском селекционном съезде в 1920 г. В течение следующих 10 лет его поло-ия активно разрабатывали и использовали растениеводы, морфологи и система-и. Однако к 40-м годам XX века интерес исследователей и практиков к закону угасать. Это объясняется тем, что наиболее популярным объектом у генетиков в ремя стали микроорганизмы. При их изучении у самых разных бактерий и низ-грибов были получены ряды фенотипически подобных мутаций, затрагивавшие наковые пищевые потребности (например, в аденине, триптофане и других ами-ислотах). Эти результаты на время обесценили закон, придали ему вид общеиз-ной, избитой истины. Такое положение дел сохранялось до тех пор, пока не на-ось прямое изучение гомологии генов на молекулярном уровне. Анализ амино-отной последовательности некоторых белков (в частности, гемоглобина и цито-а) у разных видов организмов показал их существенное сходство, что свидетель-вало о гомологии кодирующих данные аминокислотные последовательности ге-Разработанные и получившие широкое распространение в конце XX века мето-ксвенирования ДНК и клонирования генов дали огромный массив данных, по-ивших реально судить о степени сходства большого количества генов. Оказалось, для ряда генов, ответственных за метаболизм, гомология прослеживается не только ариот, но в некоторых случаях распространяется и на гены прокариот. Кроме того, ставление генетических карт целого ряда млекопитающих выявило удивительное ство расположения генов в одной хромосоме (синтению) у человека, мыши, кош-коровы, а также в случае еще более далеких между собой видов: например, челове-курицы.

Факты, подтверждающие высокую степень гомологии генов у близких видов ли-мологию отдельных генов у представителей разных классов, видов и родов, уже ле весьма многочисленны, в свете чего гомологичные гены разных видов приня-обозначать одинаковыми символами (например, в пределах класса млекопитаю-за основу берется номенклатура генов человека).

14.5. ИНГИБИТОРЫ МУТАГЕНЕЗА

з 50-х гг. XX века А. Новик и Л. Сцилард показали, что пуриновые рибонуклео-вызывают снижение уровня спонтанного и индуцированного мутационного есса у *E. coli*. Так был открыт новый класс соединений – **антимутагены.** Класси-ция их представляет не менее сложную задачу, чем классификация мутаций.

Тем не менее, С. Де Флора и С. Рэмел, разделили их на две основные группы в зависимости от места действия: *внеклеточные* (дисмутагены) и *внутриклеточные*. Еще одна классификация атимутагенов базировалась на предполагаемых механизмах их действия. Так, группа **внеклеточных антимутагенов** состоит из трех подгрупп:

1) *ингибиторы поглощения мутагенов и их предшественников* (препятствуют проникновению в организм или ускоряют выведение из организма мутагенов), например, жирные кислоты, ароматические аминокислоты и др.;

2) *ингибиторы эндогенного формирования мутагенов* (предотвращают/тормозят реакции нитрозирования или изменяют внутрикишечную флору), например, токоферолы, фенолы, аскорбиновая кислота, ферментированные молочные продукты;

3) *дезактиваторы мутагенов* (в результате физических и/или химических реакций), например, вещества, поддерживающие определенный уровень рН в жидкостях тела, а также тиолы, антиоксиданты.

Внутриклеточные ингибиторы мутагенеза также представлены тремя подгруппами:

1) *модуляторы метаболизма* (ускоряют переход мутагенов в клетки, не являющиеся мишенями, индуцируют механизмы детоксикации), например, тиолы и фенолы;

2) *инактиваторы реакционно-способных молекул* (взаимодействуют с электрофилами, улавливают кислородные радикалы, защищают нуклеофильные участки ДНК);

3) *модуляторы репликации и репарации ДНК* (увеличивают точность репликации, повышают эффективность репарации, ингибируют ошибки репарации), например, хлорид кобальта, арсенит натрия, кумарин, ванилин, тиолы, ингибиторы протеаз.

Строгость данной классификации нарушается тем, что одно и то же соединение может быть отнесено к нескольким подгруппам антимутагенов.

Что касается антимутагенных свойств пищевых компонентов, то в 1992 г. Б. Ставрик выделил из разных типов пищевых продуктов более 25 видов содержащихся в них, так называемых, химиопревентеров, среди которых – витамины, селен, кальций, флавоноиды, каротиноиды, кумарины, хлорофилл, растительные кислоты, пищевые волокна, жирные кислоты. К антимутагенам растительного происхождения принято относить капусту, зеленый перец, яблоки, лук, листья мяты, семена растений. Многие из перечисленных соединений в экспериментах снижают повреждающее действие средовых мутагенов.

Следует отметить специфичность действия антимутагенов, проявляющуюся, прежде всего, в высокой избирательности, что особенно характерно для пищевых антимутагенов вообще и витаминов, в частности. Антимутагены ингибируют эффекты одних мутагенов, а в отношении других их действие может быть прямо противоположным (так называемое комутагенное действие) или отсутствовать вовсе. Достоверно установлено, что бесспорный компонент полноценного питания – витамин С – проявляет и антимутагенные, и мутагенные, и комутагенные свойства. Комутагенное действие (усиление повреждающего влияния генотоксических соединений) способны оказывать in vitro и другие витамины, в том числе B_2 и Е. Результат зависит от дозы антимутагена, применяемой тест-системы и метода учета наблюдаемого эффекта. И, наконец, вследствие высоко специфичного действия антимутагенов по отношению к органам-мишеням, не исключена возможность защиты генетических структур в клетках одних тканей с одновременным потенцированием мутагенного эффекта в других, чему есть косвенные подтверждения.

Зопрос создания фармакологических корректоров мутагенеза остается открытым вследствие множественности мутагенных загрязнений одного и того же объекта, а по причине смешанных механизмов генотоксического действия химиопревен-ов.

14.6. ВЫЯВЛЕНИЕ МУТАГЕНОВ

ясь неотъемлемым свойством всех живых организмов, мутационный процесс, в числе и у человека, может оказывать на жизнеспособность носителей вновь воз-ющих мутаций влияние как едва заметное, так и катастрофическое. Опасное ние некоторых физических факторов и химических соединений на частоту му-й у человека, стало восприниматься в полной мере лишь по прошествии весьма олжительного периода времени с момента открытия радиационного и химиче-о мутагенеза. Причем для радиационного мутагенеза этот «лаг-период» про-ся с момента открытия мутагенного действия рентгеновских лучей до 50-х г. XX , когда уже нельзя было не замечать и не оценивать последствия испытаний ного оружия в атмосфере. Последствиям действия химических мутагенов на ки человека также долгое время (до 60-х гг.) не уделялось должного внимания. И ко после открытия химических супермутагенов эта проблема приобрела актуаль-ь. С середины 70-х гг. XX века число работ, посвященных мутагенному действию ческих веществ в среде обитания человека, стало нарастать лавинообразно. Все привело к появлению нового направления – генетической токсикологии, иссле-щей мутагенные эффекты факторов окружающей среды.

14.6.1. МУТАГЕННЫЕ ФАКТОРЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

вседневной жизни человек постоянно сталкивается с химическими мутагенами. сточниками служат производственные вредности, сельскохозяйственные ядо-каты, соединения бытовой химии, отдельные лекарства, но, прежде всего – укты питания. Согласно опубликованному в 1990 г. заключению Международ-агентства по исследованию канцерогенного риска при Всемирной организации оохранения (ВОЗ), пища является источником сложной смеси мутагенов и рогенов различной природы. Это – нитрозосоединения, растительные алкало-гетероциклические амины, флавоноиды, отдельные ароматические углеводо-и еще целый ряд химических соединений. Кроме того, пищевое сырье может загрязнено мутагенами при хранении (они могут образоваться из немутагенных шественников).

настоящему времени накоплены сведения о генотоксических эффектах (мута-ой и/или ДНК-повреждающей активности) ртути и свинца, а также марганца, , мышьяка, кадмия, кобальта, олова, никеля, хрома и цинка в концентрациях, ышающих их физиологическое количество в живых тканях. Эти неорганические

соединения поступают в организм человека с растительной и животной пищей. Реальную мутагенную опасность для человека могут представлять остаточные количества препаратов, используемых для стимуляции роста и при лечении сельскохозяйственных животных и птицы.

Образование мутагенов (полициклических ароматических углеводородов, нитрозаминов, гетероциклических аминов) неизбежно происходит в результате кулинарной обработки говядины, свинины, рыбы и птицы при температуре, превышающей 150 °С. Результаты, свидетельствующие о таких последствиях термической обработки пищевого сырья, были получены не только в модельных экспериментах, но и при непосредственном тестировании готовых блюд. В частности, положительный результат теста на мутагенность (как на микробиологических объектах, так и у животных) был получен для разных образцов так называемой «быстрой» пищи, которую готовят обычно при температуре 230 °С.

Ряд исследователей считает преувеличенными существующие представления о потенциальной опасности пищевых мутагенов, прежде всего, гетероциклических ароматических аминов, потребление которых на 5–6 порядков ниже доз, оказывающих повреждающее воздействие в экспериментальных тест-системах. Однако безоговорочно поддержать их здоровый скепсис мешают, в частности, корреляции, установленные между частотой употребления в пищу жареного мяса,уровнем гетероциклических ароматических аминов, выделяющихся с мочой, и вероятностью возникновения рака поджелудочной железы/ободочной кишки, а также другие, подобные указанным, факты.

Генотоксическое воздействие производственных загрязнителей на организм человека было продемонстрировано результатами множества независимых исследований, обобщенных в 1992 г. Н.П. Бочковым и Л.Д. Катосовой. Значительное количество промышленных производств являются источниками мутагенов, активно воздействующих на людей, непосредственно в них занятых. Это — переработка каменного угля и нефтепродуктов, добыча и газификация бурого угля, используемая во многих отраслях электросварка, производство резины, древесно-стружечных плит, стирола, винилхлорида, цитостатиков, биостимуляторов, а также поставленное на промышленную основу производство свинины и кормов для крупного рогатого скота. Кроме того, перечисленные отрасли могут быть потенциальными источниками генотоксических веществ, влияющих не только на персонал, непосредственно занятый в производстве, но и на не причастных к нему людей. Так, например, установлен повышенный уровень хромосомных перестроек у жителей окрестностей металлургических предприятий и алюминиевых производств.

В течение последних 25 лет проводится обязательная проверка на генотоксичность лекарственных препаратов с целью выявления среди них соединений, повреждающих структуру ДНК. Результаты этих исследований, были обобщены в монографии А.Д. Дурнева и С.Б. Середенина, опубликованной в 1998 г.

Таким образом, существует множество соединений, с которыми неизбежно приходится контактировать человеку, и которые потенциально опасны для его здоровья и наследственности. Однако заключение о реальной мутагенной активности каждого из них и, как следствие, предупреждение нежелательного контакта может быть сделано только на основании результатов специальных комплексных исследований.

14.6.2. СТРАТЕГИЯ ТЕСТИРОВАНИЯ НА МУТАГЕННОСТЬ

ля тестирования всех веществ, с которыми на протяжении жизни человек может итактировать, потребовался бы непомерно большой объем работы, поэтому была изнана необходимость *первоочередной* проверки на мутагенность лекарств, пище-ых добавок, пестицидов, гербицидов, инсектицидов, косметических средств, наи-олее широко распространенных загрязнителей воды и воздуха, а также производст-нных вредностей. Второй методологический принцип заключается в выборочно-и тестирования. Это означает, что вещество анализируется на мутагенность при личии двух обязательных условий: распространенности в среде обитания челове-и наличии структурного сходства с известными мутагенами или канцерогенами. сутствие универсального теста, позволяющего одномоментно регистрировать ин-кцию изучаемым веществом (и его возможными метаболитами) различных кате-ий мутаций в половых и соматических клетках, служит основанием третьего инципа – комплексного использования специализированных тест-систем. Нако-ц, четвертый методологический принцип подразумевает ступенчатость тестирова-я веществ на мутагенную активность.

Этот принцип берет начало от одной из первых и наиболее известных схем, пред-женной в 1973 г. Б. Бриджесом и предусматривавшей три последовательных этапа следования.

1. На первом этапе мутагенные свойства вещества изучали простыми и быстро полнимыми методами (с использованием микроорганизмов и дрозофилы в каче-е тест-объектов) для определения его способности индуцировать генные мута-и. Выявление такой способности предполагало запрет на применение данного щества.

2. В случае особой медицинской или экономической значимости мутагена его те-ровали на млекопитающих *in vivo*. Аналогичное исследование проводилось также веществ, не продемонстрировавших мутагенных свойств в тестах первого этапа. и исследуемый агент не проявлял мутагенных свойств, постулировалась безопас-ть применения его человеком. Вещества, проявившие мутагенность, либо запре-ли для использования, либо, если они относились к категории особо значимых, незаменимых, исследовали дополнительно.

3. На заключительном этапе проводили тестирование для установления количе-нных закономерностей мутагенного действия таких специфических веществ и нку риска применения их человеком.

Данная схема послужила прототипом целого ряда методик комплексного тести-ния на мутагенность. Принципиально новым шагом на пути развития этого на-ления следует считать программу, предложенную в 1996 г. Дж. Эшби с соавтора-Исключительно важной особенностью этой программы является ее направлен-ть не только на оценку мутагенности тестируемого вещества, но и на прогноз церогенности данного химического соединения и возможного механизма канце-неза. Современная система доказательств взаимосвязи между процессами мута-за и канцерогенеза включает целый ряд экспериментальных подтверждений об-цаемой проблемы. Среди них: 1) наличие хорошо изученных наследственных за-ваний, при которых одновременно с повышенной чувствительностью к дейст-

вию мутагенов наблюдается многократное превышение средней частоты возникновения злокачественных новообразований; 2) четко установленная сопряженность мутагенного и канцерогенного действия противоопухолевых цитостатиков, индуцирующих мутации в соматических клетках и за счет этого оказывающих терапевтическое воздействие, но способных вызывать у леченных онкологических больных развитие вторичных опухолей; 3) накопленные сведения о возможной активации протоонкогенов за счет индукции генных и хромосомных мутаций; 4) описание случаев спорадических моногенных доминантных мутаций, обусловливающих развитие опухолей различных органов.

В программе Дж. Эшби постулируется, что вещество не является канцерогеном, если оно не проявляет мутагенного и генотоксического действия *in vivo*. Те же вещества, которым названные эффекты свойственны, являются потенциальными генотоксическими канцерогенами.

14.6.3. ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Известно более 100 различных методов оценки генотоксичности. Однако реально практическое использование имеют не более 20 тест-систем.

Наиболее распространенный метод регистрации влияния ксенобиотиков (мутагенов и канцерогенов) на частоту генных мутаций предложен Брюсом Эймсом в 1975 г. Используемые в качестве тест-объекта *His*-мутанты *Salmonella typhimurium* не синтезируют гистидин и выживают на безгистидиновых средах только при возникновении обратной мутации к дикому типу *His+*. Ревертанты дикого типа образуют колонии на среде без гистидина, что и служит показателем возникновения генных мутаций. Конструирование тестерных штаммов, наиболее чувствительных к действию мутагенов, достигается инактивированием в их клетках системы эксцизионной репарации. Кроме того, клетки применяемых в тесте Эймса штаммов обладают и иными особенностями, повышающими чувствительность их к мутагенным воздействиям. Многие соединения проявляют мутагенную и канцерогенную активность только при метаболической активации ферментами млекопитающих, (ее проводят в отношении исследуемых соединений in vitro с помощью микросомной фракции печени млекопитающих). В последние годы тест Эймса был значительно усовершенствован: автоматизирована процедура тестирования, повышена чувствительность к отдельным типам мутагенов.

Принципиально новый подход к оценке генотоксичности — использование трансгенных мышей с интегрированными в геном тестерными генами. По их изменению, выявляемому, например, с помощью рестрикционного анализа, можно оценивать индукцию генных мутаций. Используя трансгенные тест-объекты, можно изучать тканевую и органную специфичность мутагенного действия.

В большинстве случаев у высших организмов мутации отдельных генов не рассматриваются, поскольку они очень редки. Вместо этого оценивают частоту возникновения мутаций в хромосоме в целом.

Первый такой метод обнаружения и определения частоты мутаций у дрозофилы — *ClB* — применил в 1927 г. Герман Мёллер. Он разработал систему, позволяющую отли-

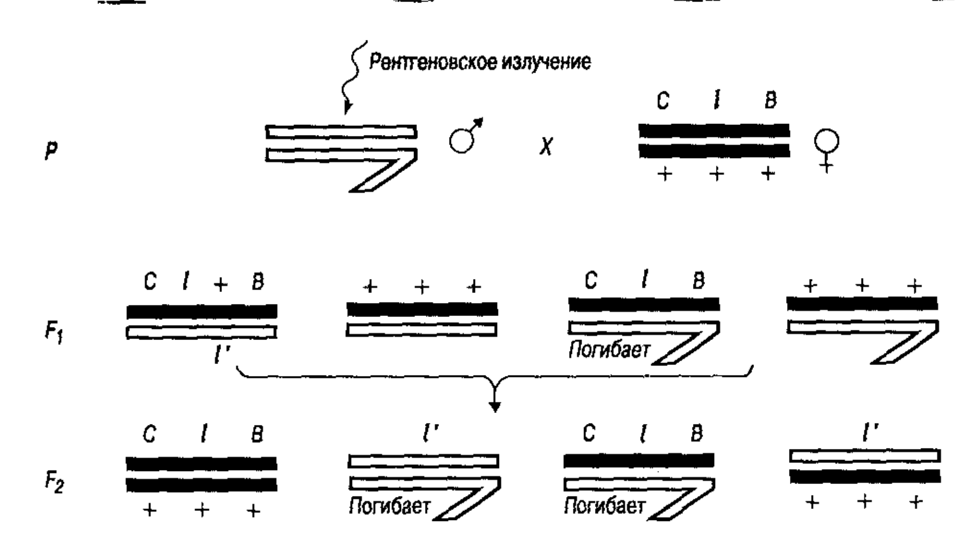


Рис. 14.9. Методика учета летальных мутаций, возникающих в половой хромосоме у дрозофилы, с использованием хромосомы *ClB*. (Из: Дубинин, 1986)

чать вновь возникшую мутацию от уже имеющихся в генотипе. Так как наиболее объективно можно учесть частоту рецессивных летальных мутаций, Г. Мёллер ввел в Х-хромосому тестерной линии дрозофилы инверсию *Cl*, которая играет роль «запирателя» кроссинговера (*C*) и обладает рецессивным летальным эффектом (*l*) . Кроме того, он маркировал Х-хромосому доминантным геном *B* (*Bar*), редуцирующим число фасеток глаза; в результате сферические в норме глаза у самок-гетерозигот приобретают бобовидную форму, а у самцов становятся щелевидными.

Самок тестерной линии *ClB* скрещивали с облученными самцами (в качестве мутагена могло выступать и химическое соединение). Из первого поколения выбирали самок *ClB/+* для постановки индивидуальных скрещиваний (рис. 14.9).

Так как самцы с генотипом *ClB/Y* погибают независимо от возникновения новой летальной мутации, в случае ее отсутствия расщепление по полу во втором поколении будет 2:1. Отсутствие во втором поколении самцов X®Y свидетельствует о возникновении в Х-хромосоме летальной мутации. Ее частота выражается отношением числа Х-хромосом, точнее – пробирок с индивидуальными скрещиваниями, где была обнаружена новая летальная мутация, к общему числу пробирок данной выборки.

Следует помнить, что у самок первого поколения между половыми хромосомами иногда может происходить двойиой кроссинговер, что приводит к снижению истинной частоты летальных мутаций. В настоящее время метод ClB утратил свое практическое значение.

Вместо него используется предложенный в дальнейшем тем же автором метод **Мёллер-5**. У самок линии-анализатора: обе Х-хромосомы содержат по две инверсии, не связанные с летальным действием: sc^8 (редуцированные щетинки) захватывает большую часть Х-хромосомы, *δ49* - инверсия в средней части Х-хромосомы. Следствием этих инверсий является практически полное исключение перекреста между

Рис. 14.10. Метод Меллер-5 для .учета летальных и других мутаций, возникающих в X-хромосоме у дрозофилы (Из: Дубинин, 1986).

Черным цветом обозначена хромосома, несущая летальную мутацию.

хромосомами. Дополнительно обе X-хромосомы самки маркированы геном желтой окраски тела и щетинок *yellow* (*y*). Самцы в такой линии жизнеспособны.

Если у взятого для исследования самца дикого типа нет мутации в X-хромосоме, то, после скрещивания его с самкой из линии-анализатора, во втором поколении мы получим по 2 фенотипических класса самок и самцов (рис. 14.10). Если же в анализируемой X-хромосоме исследуемого самца возникла летальная мутация, то во втором поколении все самцы будут принадлежать к одному фенотипическому классу (sc^8y *d49*) – желтые с редуцированными щетинками. При этом каждая индивидуальная культура второго поколения, являющаяся потомством одной самки F_1, соответствует одной исследованной X-хромосоме самца из родительского поколения.

Метод Меллер-5, как и тест Эймса, широко применяется для контроля химических соединений, используемых при консервировании пищевых продуктов, изготовлении косметических препаратов и т.п.

Для оценки способности агентов индуцировать хромосомные мутации широко используются цитогенетические методы учета хромосомных аберраций в метафазных клетках пролиферирующих тканей in vitro или *in vivo*. Недостаток этих методов состоит в том, что они достаточно субъективны (поскольку основаны на микроскопировании), требуют высокой квалификации исследователя и плохо поддаются автоматизации.

В качестве альтернативы был предложен метод учета микроядер (внутриклеточные хроматиновые образования, сформированные из ацентрических фрагментов хромосом и цельных хромосом, отставших в анафазе из-за дефектов веретена деления) в полихроматофильных эритроцитах костного мозга грызунов, который может быть автоматизирован и, кроме того, применен к любой пролиферирующей ткани, включая гонады.

Для оценки индукции хромосомных мутаций в зародышевых клетках млекопитающих используют учет либо **доминантных летальных мутаций**, либо **наследуемых транслокаций** (последний более специфичен для решении данной задачи).

Очевидно, что максимальное приближение исследователя к оценке генетического риска вследствие действия мутагенов внешней среды возможно только при использовании в качестве тест-систем клеток человека. В таких экспериментах обычно используются лимфоциты периферической крови и, как возможный вариант – клетки костного мозга, эпителия волосяных фолликулов, а также эмбриональные фибробласты и сперматозоиды.

Публиковавшиеся в периодических научных изданиях результаты тестирования на мутагенность свидетельствовали об отсутствии единого стандарта в этой процедуре. В экспериментах in vitro различия чаще всего касались условий метаболической активации, *in vivo* - уровня доз, путей введения, сроков экспозиции и некоторых других экспериментальных параметров. Значительным итогом многолетнего обобщения результатов разработки и стандартизации испытаний на генотоксичность явилось выпущенное в 1989 г. ВОЗ «Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ», а также материалы 2-го Международного рабочего совещания в Мельбурне 1994 года. Фармакологический комитет МЗ и МП Российской федерации в 1994 г. опубликовал нормативный документ – методические рекомендации «Оценка мутагенности новых лекарственных средств».

В рамках курируемой ВОЗ Международной программы по химической безопасности (International Programme on Chemical Safety, IPCS) были разработаны методические рекомендации для мониторинга генотоксических влияний на организм человека мутагенов и канцерогенов. В последней версии рекомендаций от 2000 г. предлагается следующий набор тестов:

1) цитогенетические методы – классический анализ хромосомных аберраций в лимфоцитах периферической крови, флуоресцентная гибридизация in situ (FISH), определение микроядер (МЯ) в лимфоцитах и эпителиальных клетках;

2) анализ повреждений ДНК – определение аддуктов, одно- и двухцепочечных разрывов, перекрестных сшивок, щелочелабильных сайтов с помощью биохимических и электрофоретических (кометный тест) методик, определение сестринских хроматидных обменов (СХО);

3) учет образования аддуктов мутагена с белками и мутаций в локусе гипоксантин-гуанин–фосфорибозилтрансферазы (ГГФРТ).

Один из рекомендованных тестов – кометный (гель-электрофорез отдельной клетки) позволяет определить одно- и двухцепочечные разрывы, щелочелабильные сайты, перекрестные сшивки молекул ДНК, а также участки с неполной эксцизионной репарацией в индивидуальной клетке. Материалом для кометного теста могут служить лейкоциты и лимфоциты периферической крови, сперматозоиды, буккальные клетки, клетки желудочного и назального эпителия, суспензию которых заключают в агарозный слой на предметном стекле. Затем клетки лизируют детергентами или растворами солей, и высвобожденную ДНК подвергают электрофорезу в нейтральных или щелочных условиях. ДНК отдельной клетки в процессе миграции к аноду образует так называемую «комету» с характерными «головой» и «хвостом», которую визуализируют с помощью флуоресцентной или световой микроскопии после окрашивания соответствующими красителями. При повреждении ДНК процесс ее миграции к аноду нарушен. Подсчитывают длину кометы, длину хвоста и момент

хвоста (отношение длины хвоста к длине всей кометы). Нейтральный вариант кометного теста позволяет определить двухцепочечные разрывы ДНК, щелочной вариант (в зависимости от значения pH) – одно- и двухцепочечные разрывы, щелочелабильные сайты, участки с неполной эксцизионной репарацией, перекрестные сшивки ДНК-ДНК и ДНК-белок.

Чрезвычайно важно, что с помощью этого метода удается выявить фракцию клеток с поврежденной ДНК внутри большой популяции непораженных клеток. Разные модификации метода (применение специфических антител против поврежденных участков или специфических ферментов репарации ДНК) позволяют определить специфические классы аддуктов ДНК (например, тимидиновые димеры, участки окислительного повреждения).

Согласно другому документу IPCS (2001 г.) «*Биомаркеры при оценке риска. Валидность и верификация*», после окончательной расшифровки генома человека наибольшую роль при определении генотоксических воздействий будут играть методики выявления полиморфизма одиночных нуклеотидов и технологии создания микроматриц и микрочипов ДНК и белков.

Тем не менее, пока в большинстве случаев оценка генетического риска основана на экстраполяции экспериментальных данных от одного тест-объекта на другой, от высоких доз на низкие и т.д., и, в конечном итоге, от модельных систем in vitro/*in vivo* – на человека.

Практически все исследователи считают проблему количественной экстраполяции чрезвычайно затрудненной, если вообще возможной. Причиной тому являются видовые, возрастные и индивидуальные особенности метаболизма, а также детоксицирующих и репарирующих систем и многих других параметров. Метаболические особенности человека могут существенно повышать или понижать мутагенный эффект химических соединений. Следовательно, для правильной экстраполяции необходимо знать метаболизм конкретного мутагена и у животных, и у человека.

Кроме того, количественные закономерности мутационного процесса неодинаковы у разных животных, в том числе, и при сравнении их с человеком. В зависимости от состава сравниваемых пар индуцированный мутагенез у человека может быть выражен сильнее или слабее. Например, показано, что человек более устойчив к мутагенному действию радиации, чем мышь. Не исключено, что таково же соотношение и в случае действия химических мутагенов. Существование количественных различий в результатах индуцированного радиационного мутагенеза связано с видовыми особенностями функционирования репарационных систем, которые способны восстанавливать первичные повреждения, имеющие потенциальный характер и не обязательно реализующиеся в мутации.

Немаловажно и то, что диапазон тех доз, которые используют в эксперименте, как правило, на 2 порядка и более отличается от тех, с которыми реально сталкивается человек. И это только малая часть трудностей, описанию которых можно было бы посвятить отдельную главу.

Тем не менее, в 1980 г. Ф. Собелсом сформулировал принцип экстраполяции, получивший название «*правило параллелограмма*». Его используют в тех случаях, когда необходимые данные невозможно получить путем прямых измерений. Например, в экспериментах на мышах можно сравнить частоту мутаций в соматических (А) и за-

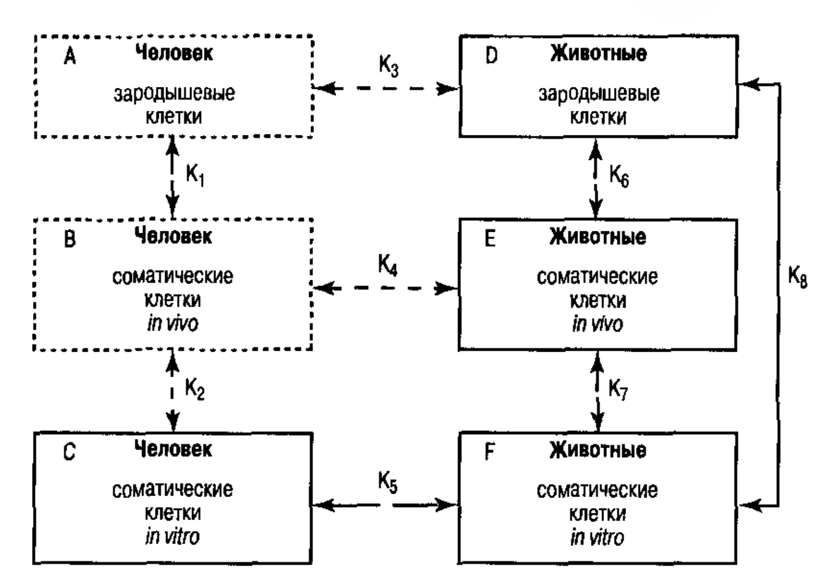


Рис. 14.11. Сравнение мутагенного эффекта в разных клетках человека и животных для целей экстраполяции. (Из: Бочков и Чеботарев, 1989)

К1-К8 коэффициенты сравнения при экстраполяции Сплошные линии означают, что сравнение результатов экспериментов возможно в любых комбинациях Пунктирные стрелки – сопоставления ограничены. А и В – эксперименты невозможны, но возможны наблюдения.

родышевых (А′) клетках. Установив частоту индуцированных мутаций в соматических клетках человека (В) и предположив, что отношение частот мутаций в зародышевых клетках к частотам в соматических одинаковое у мыши и человека (А/А′ = В/В′), можно составить представление о возможной частоте мутаций в зародышевых клетках человека (В′). Правило параллелограмма допустимо применять строго при условии линейной зависимости эффекта от дозы. Несмотря на такое ограничение, правило параллелограмма может оказывать реальную помощь для оценки генетического риска влияния мутагенов. Это было подтверждено, в частности, на примере четырех мутагенов: акриламида, этиленоксида, циклофосфана и 1,3-бутадиена.

Н.П. Бочков и А.Н. Чеботарев в 1989 г., предложили схему (рис. 14.11), отражающую принцип прогнозирования мутагенного эффекта в зародышевых клетках по имеющимся данным о действии тестируемого соединения на другие объекты и закономерностям сопоставления эффектов в различных системах. Те же авторы в качестве одного из основных условий, повышающих точность экстраполяции, выдвигают максимально возможное сокращение числа ее ступеней и подчеркивают важность расширения знаний о мутационном процессе для объективного выбора моделей и выяснения границ экстраполяционных возможностей.

глава 15

НЕХРОМОСОМНАЯ НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ

В 1909 г. К. Корренс на *Mirabilis jalapa* (ночной красавице) и Э. Баур на *Pelargonium zonale* (герани) обнаружили, что наследование пестролистности этих растений (чередование белых и зеленых участков на листьях) не подчиняется законам Менделя. Первоначально такой тип наследования назвали цитоплазматическим, позднее появились и другие термины: нехромосомная, внеядерная или неменделевская наследственность. В 1962–1964 гг было установлено, что носителем генетической информации в случае внеядерной наследственности является ДНК цитоплазматических органелл (хлоропластов или митохондрий). Таким образом, выяснилось, что генетическая информация в эукариотических клетках поделена между двумя системами, одна их которых находится в ядре (хромосомы), а другая в ДНК пластид (хлоропласты) и митохондрий. Нехромосомная ДНК имеется и у прокариот (плазмиды). Кроме того, оказалось, что и у эукариот, и у прокариот есть как постоянные, так и факультативные генетические элементы не только в ядре (нуклеоиде у прокариот), но и во внеядерных структурах.

К прокариотам относят бактерии (зеленые, пурпурные и др.) и синезеленые водоросли. Одноклеточные эукариоты включают такие простейшие формы (протисты) как амебы, инфузории, дрожжи, диатомовые водоросли, хламидомонады. К многоклеточным эукариотам относят бурые, красные и зеленые водоросли, папоротники, мхи, грибы, покрытосеменные растения, беспозвоночные и позвоночные организмы. Основное отличие прокариот от эукариот состоит в том, что нуклеоид у них не окружен ядерной мембраной, в то время как у эукариот в клетке всегда есть ядро с ядерной мембраной (нуклеотип). К постоянным генетическим элементам прокариот относят: 1) ДНК нуклеоида, 2) ДНК плазмид, включая эписомы; эти нехромосомные элементы могут находиться в свободном состоянии, но могут и интегрироваться в хромосому (табл. 15.1).

Облигатная генетическая система эукариот включает не только рассмотренную ДНК, находящуюся в ядре, но и ДНК цитоплазматических органелл – митохондрий и хлоропластов (цитотип).

Наряду с постоянными генетическими элементами у прокариот и у эукариот имеются факультативные элементы, как с ядерной, так и с цитоплазматической локализацией. У прокариот к факультативным элементам генотипа относят инсерции (IS), транспозоны (Tn) и бактериофаги.

Факультативные генетические элементы у эукариот представлены мобильными диспергированными генами (МДГ), транспозонами, вирусами; для всех этих элементов характерна смена мест локализации.

[Табл]ица 15.1. Облигатные и факультативные генетические элементы у прокариот и эукариот

[Орг]анизмы	Прокариоты		Эукариоты	
	Бактерии, синезеленые водоросли		Грибы, растения, б/позв., позвоночные	
[Комп]арт[амен]ты	Ядро	Цитоплазма	Ядро	Цитоплазма
[ДН]К	Нуклеоид	Плазмиды	Нуклеотип	Цитотип
[Обл]игатные [ген]етические [эле]менты	Гены с постоянной локализацией в нуклеоиде	Плазмиды, эписомы свободные и интегрированные в хромосому	Гены, имеющие постоянную локализацию в хромосомах	ДНК митохондрий и хлоропластов
[Фак]ультатив[ные] генети[чес]кие эле[мен]ты	1. Инсерции 2. Транспозоны 3. Бактериофаги 4. Бактерии: *Holosspora acuminata* в микронуклеусе у *Paramecium bursaria* нарушают процесс полового размножения	Симбиотические бактерии: *Caulobacter* taeniospiralis (к-частицы) у *Paramecium aureli* выделяют парамецин, убивающий другие бактерии. 2. Симбиотические водоросли: *Chlorella* у парамеции (туфельки). 3. *Tox*+-транспозоны плазмид, кодирующие образование токсинов (дифтерийного или ботулинического)	1. Мобильные диспергированные гены (МДГ) Синонимы МДГ = МГЭ, copia-элементы ретротранспозоны. 2. Вирусы 3. В-хромосомы 4. Амплифицированные копии ДНК	1. Спироплазмы: Sex ratio-SR-фактор убивает эмбрионы XY, XO 2. Вирусы: σ-вирус у дрозофилы повышает чувствительность к CO_2 3.Экстрахромосомные элементы: δ-элемент 2-ой хромосомы у дрозофилы, вызывает гибель женских эмбрионов

[В] клетках одних прокариот могут находиться клетки других прокариот, а также [виру]сы и экстрахромосомные элементы; в эукариотических клетках могут присутст[вова]ть вирусы, бактерии и экстрахромосомные элементы. Генетические системы хо[зяин]а и «гостя» взаимодействуют по-разному. Один из вариантов их взаимоотноше[ний —] *симбиоз*, например, между бактериями рода *Rhisobium* и бобовыми растения[ми, п]омогающий последним усваивать азот.

[К] *паразитизму* можно отнести взаимодействие агробактерий и растений, по[скол]ьку бактерии заставляют растительные клетки синтезировать опины, использу[емы]е агробактериями как источник углерода и азота. При этом у растений образуют[ся о]пухоли, в которых синтезируются опины. Эта трансформация контролируется [гена]ми, локализованными в ДНК Ti-плазмид.

15.1. ПЛАСТИДНЫЙ (ХЛОРОПЛАСТНЫЙ) ГЕНОМ

Хлоропласты цитоплазматические органеллы растений и водорослей с собственной, хотя и полуавтономной, генетической системой. Синтез соединений, входящих в состав мембран хлоропластов, и процессы, происходящие в ее субкомпартментах, находятся под контролем двух генетических систем: ядра и хлоропласта. Поэтому кратко остановимся на структурных особенностях и специфике функционирования этой клеточной органеллы.

Хлоропласты – внутриклеточные органеллы растений и водорослей, имеющие три типа мембран: высокопроницаемую наружную и менее проницаемую внутреннюю мембрану. Эти две мембраны разделены межмембранным пространством. Внутренняя мембрана окружает центральную область – строму, содержащую ферменты, рибосомы, РНК и ДНК (рис. 15.1). В хлоропластах имеются также тилакоиды – структуры, напоминающие уплощенные пузырьки, уложенные в стопки (гранулы). В третьей – тилакоидной мембране находятся фотосистемы II и I, электрон-транспортная цепь, связывающая эти системы, и АТР-синтетаза.

Молекулы хлорофилла, входят, наряду с белками, в состав фотосистем. Фотосистема II катализирует удаление электронов из молекулы воды, а фотосистема I ответственна за восстановление $NADP^+$.

В процессе фотосинтеза за счет энергии света образуются молекулы АТР и NADPH, необходимые для превращения CO_2 в углеводы (рис. 15.2).

У водорослей и растений число пластид на клетку может превысить два десятка. Районы хлоропласта, в которых находятся молекулы ДНК, по аналогии с прокариотическими клетками, называются *нуклеоидами*. В клетках растений хлоропластный геном многократно повторен. Подсчитано, что в каждой растительной клетке при наличии более десятка хлоропластов и нескольких молекул ДНК в каждом нуклео-

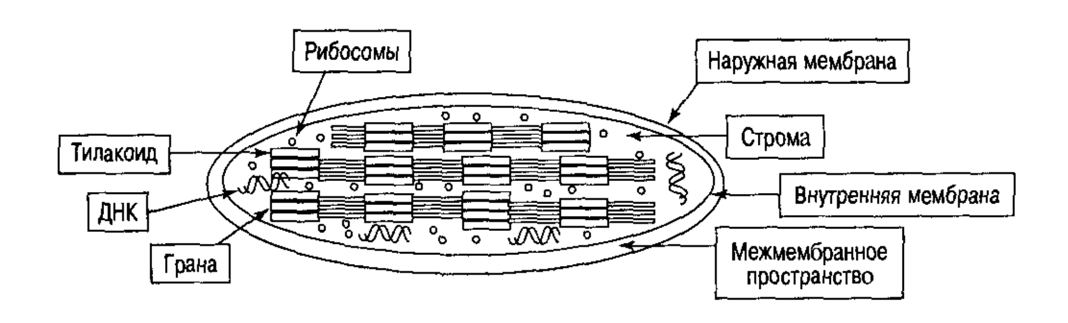


Рис. 15.1. Структура хлоропластов. (По: Зенгбуш, 1982; Албертс, Брей с соавторами, 1994)

Хлоропласты содержат три мембраны наружную, внутреннюю и тилакоидную, а также три компартмента: строму, межмембранное пространство и тилакоидное пространство

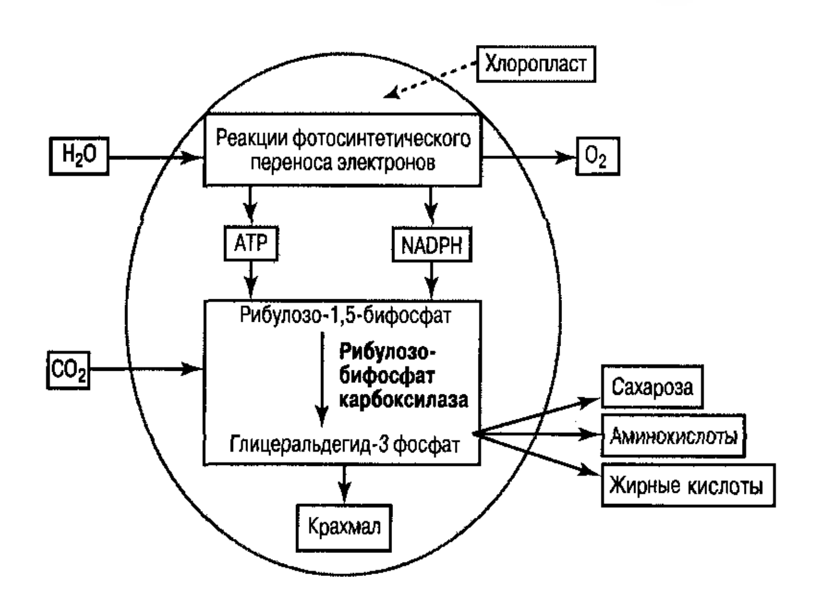


Рис. 15.2. Световой и темновой этапы фотосинтеза. (Из: Албертс, Брей с соавт., 1994)
В электрон-транспортной реакции окисляется вода и выделяется кислород, в реакции фиксации углерода ассимилируется CO_2 и образуются органические молекулы

иде, число хлДНК (или геномов) может достигать нескольких тысяч. Увеличение копийности ДНК хлоропластов можно сравнить с полиплоидией – увеличением количества хромосомных наборов в ядре клетки.

ДНК хлоропластов имеет кольцевую форму. Длина молекул хлДНК варьирует от 135 т.п.н. у *Euglena gracilis* до 200–220 т.п.н. у *Pelargonium zonale*.

Зеленые растения содержат в хлоропластной ДНК около 100–120 генов. К хлоропластному геному относятся:

- 30 генов тРНК;
- гены рРНК (rRNA) – 4.5S; 5S; 16S; 23S;
- 20 генов рибосомных белков малой и большой субъединиц;
- ген трансляционного фактора IF1;
- часть генов, кодирующих белковые компоненты фотосистемы I и II;
- гены белков электрон-транспортной системы;
- ген субъединицы никотинаминадениннуклеотид (NADH)-дегидрогеназы (рис. 15.3).

Большая часть генов, кодирующих трансляционные факторы, рибосомные белки, белки фотосистем I и II, белки компонентов электрон-транспортной цепи, связывающей фотосистему II с фотосистемой I, кодируются ядерными генами. Без участия ядерных генов невозможен синтез белков на рибосомах хлоропластов и осуществление основной функции хлоропластов – фотосинтеза.

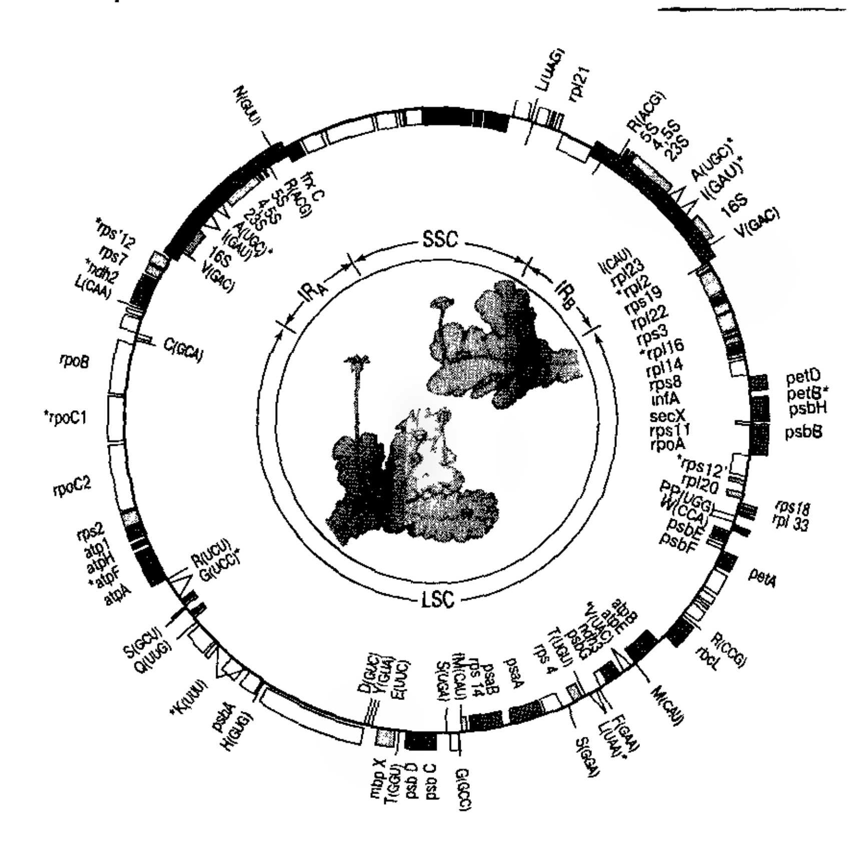


Рис. 15.3. Хлоропластный геном мха-печеночника *Marchantia polymorpha*. (Из: Griffiths et al., 2000)

Обозначения Rps – *30S рибосомные белки малой субъединицы*; Rpl – *50S рибосомные белки большой субъединицы* Trn – тРНК с указанием кода аминокислоты; 4.5, 5S, 16S, 23S-рРНК; infA – фактор инициации; sex X – 50S-рибосомный белок

Фотосинтез и электронный транспорт: Rbc – рибулозобифосфат-карбоксилаза; Psa – *фотосистема 1*; Psb – *фотосистема 2*; Pet – *цитохром b|f комплекс*; Atp – FTP-синтетаза; Frx – железо-серные белки; ndh – NAD(P)H-оксиредуктаза

Транскрипция:

Rpo – RNA-полимераза

При образовании гибридных белков в хлоропластах происходит объединение субъединиц, одни из которых синтезированы на рибосомах цитоплазмы, другие – на рибосомах хлоропласта. Например, фермент рибулозо-1,5- дифосфаткарбоксилаза, участвующий в образовании молекул 3-фосфоглицерата из рибулозо-1,5-дифосфата и CO_2, состоит из двух субъединиц, одна из которых (rbc L) кодируется хлоропластным геном.

Таким образом, различные элементы белок-синтезирующей системы хлоропластов контролируются либо собственными генами (гены: тРНК, рРНК, фактор IF1, субъединицы никотинаминадениннуклеотид (NADH)-дегидрогеназы), либо ядерными генами (факторы элонгации и терминации трансляции, большинство рибо-

Таблица 15.2. **Наследование пестролистности у ночной красавицы и герани**

Растение	*Mirabilis* (ночная красавица)	
Направление скрещивания	Прямое	Обратное
Родительские формы	♀ Зеленые × ♂ Петролистные	♀ Пестролистные × ♂ Зеленые
F_1-поколение	Все зеленые	Зеленые, пестролистные и белые
Растение	***Pelargonium*** **(герань)**	
Направление скрещивания	Прямое	Обратное
Родительские формы	♀ Зеленые × ♂ Пестролистные	♀ Петролистные × ♂ Зеленые
F_1-поколение	Главным образом зеленые, в меньшем проценте петролистные и белые	

:омных белков), либо находятся под двойным контролем (белковые компоненты фотосистем и белки электрон-транспортной системы).

В хлоропластной ДНК одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardii* имеются гены устойчивости к различным антибиотикам: стрептомицину (*sm*), эритромицину (*ery*), олеандомицину (*ole*), неомицину (*nea*). Мутации устойчивости к антибиотикам наследуются, как правило, по материнской линии, поскольку в зиготе присутствует только материнская хлДНК. Однако в редких случаях у хламидомонады сохраняется хлоропласт и от второго родителя, тогда зигота становится гетерозиготой. Такие гетерозиготы получили название **цитогеты**. При митотическом делении зооспор на стадии четырех нитей, т.е. в удвоенных молекулах хлДНК, между хлоропластными генами может происходить рекомбинация. До появления молекулярно-генетических методов картирование хлоропластных генов осуществлялось при изучении частоты рекомбинации между генами и между генами и центромерой.

Наследование пестролистности у растениий. Опыты К. Корренса и Э. Баура. Признак белозеленой пестролистности у ночной красавицы наследуется по материнской линии вне зависимости от направления скрещивания (табл.15.2). Корренс предположил наличие «смешанных клеток» в пестрых участках ткани, в которых содержатся как зеленые так и бесцветные пластиды. Позднее Реннер и Баур выдвинули гипотезу, согласно которой пластиды (хлоропласты) являются носителями наследственности, и тип окраски передается дочерним пластидам при их делении.

В отличие от ночной красавицы у герани небольшое число пластид передается по мужской линии (двуродительское наследование). Как показали более поздние исследования Тилни–Бассет (1970), наследование окраски листьев находится под ядерным контролем и под контролем пластид женского родителя (мужской родитель оказывает незначительное влияние из-за малого количества пластид в спермиях и большого – в яйцеклетке).

В дальнейших исследованиях было выяснено, что биосинтез хлорофилла, от которого зависит окраска листа, контролируется главным образом ядерными генами. Однако некоторые гены локализованы в пластидной ДНК. Окраска хлоропластов зависит от фотосинтезируемого пигмента – хлорофилла. Различные формы хлоро-

филла отличаются по спектрам поглощения. Хлорофиллы *a* и *b* обеспечивают зеленую окраску, хлорофилл *c* – желтую и коричневую.

При действии мутаций, нарушающих биосинтез хлорофилла, в хлоропластах не образуется пигмент. В случае пестролистности материнского растения в яйцеклетке присутствуют пластиды двух типов: нормальные и мутантные, у которых зеленого хлорофилла нет. При делении зиготы пластиды случайно распределяются по дочерним клеткам, в результате листья у нового поколения растений могут быть: зелеными, белыми, либо пестрыми с чередующимися зелеными и белыми участками.

15.2. МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ГЕНОМ

Митохондрии – это цитоплазматические органеллы в клетках животных и растений. Функция митохондрий как энергетической фабрики клетки заключается в синтезе АТР. Синтез этой молекулы осуществляется в процессах транспорта электронов и

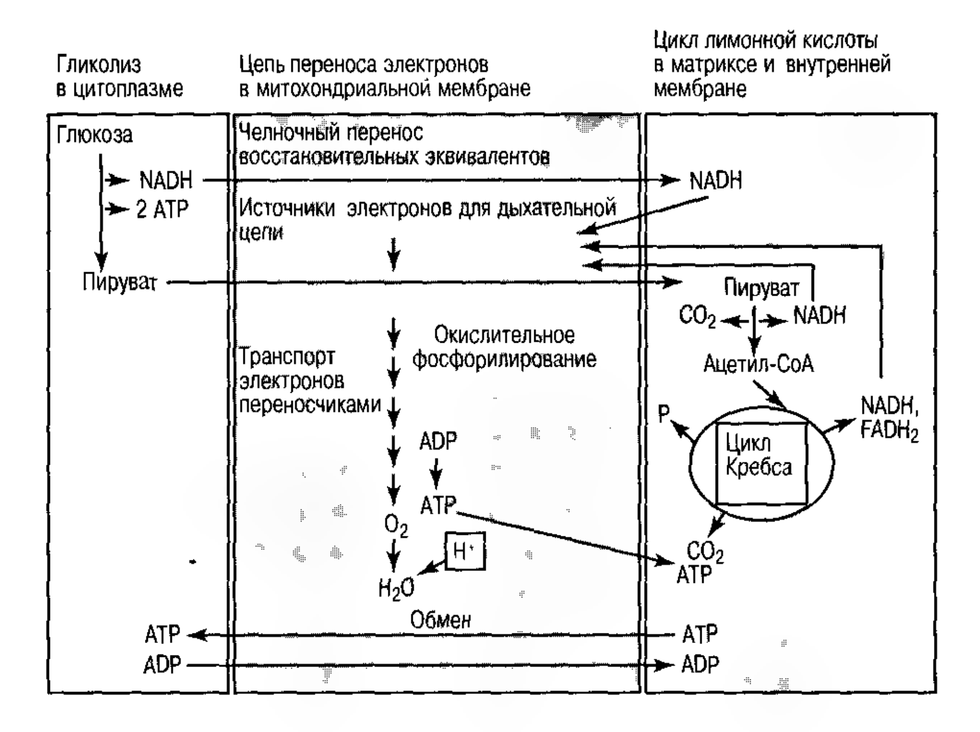


Рис. 15.4. Этапы окисления глюкозы (По: В. Элиот и Д. Эллиот, 1999)

На первом этапе в цитоплазме клетки происходит гликолиз глюкозы с образованием пирувата (*СН3СОСОО-аниона пировиноградной кислоты*), NADH (*восстановленной формы никотинамиладениндинуклеотида*) и 2 АТР.

Второй этап - цикл Кребса (цикл лимонной кислоты) происходит в митохондриях.

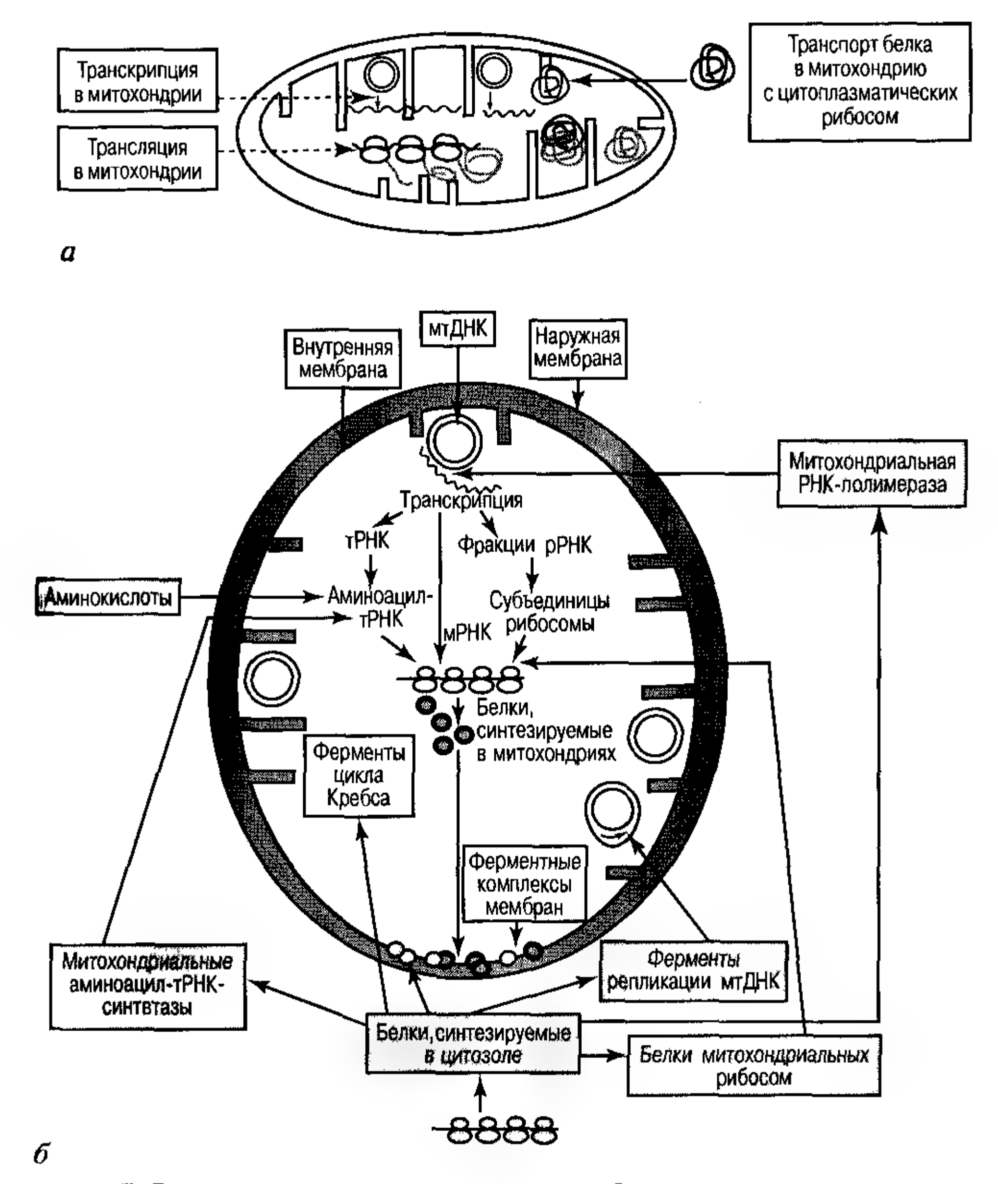


Рис. 15.5. Взаимодействие ядра и митохондрий: *а* — белковые комплексы митохондрий образуются из продуктов экспрессии ядерных и митохондриальных генов (по: Льюин, 1987); *б* — взаимодействие генетических систем ядра и митохондрий. (*По:* Албертс и др., 1994)

В ядерном геноме закодировано не менее 90 белков, в том числе ферменты цикла Кребса, *много рибосомных белков, аминоацил-тРНК-синтетаза, ферменты репликации ДНК, фермент* РНК-полимераза, ферменты процессинга РНК. Белки, синтезируемые в цитозоле, переносятся в митохондрии. мтДНК человека кодирует только мРНК 13 полипептидов, рРНК и тРНК.

окислительного фосфорилирования. В митохондриях происходит окисление молекулярным кислородом пирувата и жирных кислот до CO_2 и H_2O. Это энергетически выгодный процесс, поскольку на одну молекулу окисляемой глюкозы образуется 36 молекул АТР, а не две, как при гликолизе глюкозы (рис. 15.4). Снижение энергетического обеспечения клеток особенно тяжело сказывается на тех тканях и органах, в которых происходят энергоемкие процессы. Так у человека мутации в молекуле мтДНК приводят к тяжелым болезням, от которых в большей степени страдают нервная система, мышцы, органы зрения и сердце (см. гл. 22.2).

У простейших (парамеции и трипаносомы) размер митохондриального генома составляет 22 т.п.н., у животных – 16–19 т.п.н., а у растений на 1–2 порядка больше (150 -2 500 т.п.н.). У животных в одной митохондрии может быть от 2 до 50 молекул ДНК. Что касается числа митохондрий в клетке, то оно значительно варьирует: от нескольких десятков у дрожжей, до 1000 в печени крысы и миллионов – в яйцеклетке лягушки. Таким образом, копийность митохондриального генома измеряется в десятках и тысячах молекул ДНК на клетку. Разницу в этих цифрах можно объяснить функциональной различной значимостью митохондрий для разного типа клеток.

Митохондрии находятся в цитоплазме эукариотических клеток, как животных, так и растений. Эти клеточные органеллы имеют наружную и внутреннюю мембрану, образующую многочисленные складки – кристы. Наружная мембрана содержит белок порин, образующий каналы в липидном бислое. В состав внутренней мембраны входят транспортные белки, ферментный комплекс АТР-синтетаза, а также комплексы ферментов, участвующих в переносе электронов и окислительном фосфорилировании. В матриксе митохондрий находятся копии ДНК, рибосомы, тРНК и ферменты, превращающие пируват и жирные кислоты в ацетил-СоА, окисляемый в цикле лимонной кислоты. Белковые субъединицы, синтезированные на рибосомах цитоплазмы, поступают в митохондрии и соединяются с митохондриальными белками при образовании олигомерных комплексов (рис. 15.5).

15.2.1. МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ГЕНОМ РАСТЕНИЙ

Митохондрии, как поставщики энергии, присутствуют как в эукариотических, так и в прокариотических клетках. У растений хлоропласты в ночное время прекращают синтез молекул АТР, в это время суток эти высокоэнергетические молекулы синтезируются в митохондриях. Форма митохондриальной ДНК, как правило, кольцевая. Однако некоторые виды одноклеточной водоросли хламидомонады (*C. reinhardii*, *C. smithi*) имеют линейную форму мтДНК.

Размер мтДНК у растений измеряется в сотнях и тысячах п.н. Так у дикой редьки размер мтДНК – 218, кукурузы – 367 т.п.н. Большая часть митохондриального генома растений имеет различные некодирующие последовательности, включая длинные повторы, создающие возможность внутримолекулярной рекомбинации. Эта особенность отличает митохондриальный геном растений от мтДНК животных и человека, у которых, за редким исключением, отсутствуют такие последовательности как повторы и интроны. В отличие от хлоропластов в митохондриях растений (кукурузы, сорго, фасоли, подсолнечника) встречаются кольцевые и линейные плазмиды.

.инейные плазмиды кукурузы имеют инвертированные повторы — TIR; такие же овторы есть в мтДНК, что увеличивает вероятность процесса рекомбинации и внерения плазмид в мтДНК.

Митохондриальный геном растений невелик, он кодирует:

рибосомные РНК;

некоторые рибосомные белки (у высших растений);

от 4 до 30 тРНК;

- 9 субъединиц NADH-дегидрогеназы, катализирующих окислительно-восстановительные реакции;
- 5 белков, участвующих в биогенезе цитохрома *c* — переносчика электронов от комплекса III к комплексу IV;
- 3 субъединицы цитохромоксидазы (комплекс IV);
- 4 субъединицы АТРазы, которая использует поток протонов для синтеза АТР из ADP и P_i.

Однако большая часть рибосомных белков и белков, обеспечивающих процесс окислительного фосфорилирования, кодируется ядерными генами.

15.2.2. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТИ РАСТЕНИЙ (ЦМС)

В 30-х годах XX-го столетия М. Родсом в США и М.И. Хаджиновым в СССР был открыт материнский тип наследования стерильности пыльцы у кукурузы. При опылении кукурузы с ЦМС фертильной пыльцой нормальных растений получается потомство со стерильной пыльцой. Замена хромосом материнской линии на хромосомы отцовской линии путем возвратных скрещиваний не приводила к восстановлению фертильности. На основании результатов этих скрещиваний был сделан вывод, что ЦМС наследуется по материнскому типу.

Цитоплазматическая мужская стерильность известна более чем у 300 видов растений. Формирование фертильной пыльцы находится под контролем как ядерных, так и цитоплазматических генов. Стерильность пыльцы может быть вызвана как действием ядерных генов (генная мужская стерильность, ГМС), так и цитоплазматических генов, проявление которых находится под контролем ядерных генов (цитоплазматическая мужская стерильность, ЦМС).

За последние годы благодаря развитию методов молекулярной генетики выявлены гены, обусловливающие ЦМС. Установлено, что цитоплазматические гены стерильных цитоплазм плейотропны и влияют на такие признаки как продуктивность, мутабильность, партеногенез.

Как оказалось, многие митохондриальные гены ЦМС образовались в результате рекомбинации и состоят из частей различных генов. Так митохондриальный ген петунии *pcf* состоит из частей трех генов: *atp9*, *cox II*, *urfS*. Предполагают, что гибридный белок, кодируемый геном *pcf*, включается в митохондриальные мембраны и вызывает нарушение в дыхательной цепи митохондрий. Однако в некоторых линиях

петунии при наличии доминантного ядерного гена *Rf* – восстановителя фертильности происходит снижение количества транскриптов митохондриального гена *pcf*.

Выяснена молекулярная природа стерильности типа *petiolaris* (PET1) у подсолнечника. Инсерция повторяющейся последовательности (265 п.н.) в ген *atpA* у этого растения приводит к образованию новой открытой рамки считывания (orf522), и как следствие – к трансляции ЦМС-специфического белка. Однако влияние ЦМС-обусловливающего митохондриального гена *orf522* может быть подавлено ядерным геном – восстановителем фертильности.

Митохондриальные гены у растений и их экспрессия отличаются следующими особенностями:

1) в митохондриальных генах есть промоторные области;

2) экспрессия митохондриальных генов не требует кэпированиия и полиаденилирования;

3) созревание мтДНК заключается в следующих процессах: сплайсинге при наличии интронов в гене, формировании 5'- и 3'-концов с образованием шпилек на 3'-конце; а также в редактировании транскриптов с преобразованием C → U и U → C (в результате редактирования транскриптов формируются правильные инициаторные и нонсенс-кодоны, одни смысловые кодоны превращаются в другие).

Таким образом, для экспрессии митохондриальных генов растений характерны эукариотические черты (за исключением пункта 2).

15.2.3. МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ГЕНОМ ДРОЖЖЕЙ

МтДНК дрожжей в несколько раз больше, чем у человека (80 т.п.н.). Карты митохондриального генома дрожжей и человека представлены на рис. 15.6. Гены мтДНК дрожжей кодируют большую и малую рРНК, тРНК, субъединицы цитохром-*c*-оксидазы, 9-ю субъединицу АТРазы, цитохром *b*. В митохондриальном геноме дрожжей есть также гены устойчивости к антибиотикам.

Изучение молекулярной природы митохондриальных мутаций показало, что различные штаммы дрожжей отличаются по некодирующим и кодирующим участкам генома. В отличие от мтДНК человека, в генах которой не выявлены интроны, в некоторых генах мтДНК дрожжей они имеются; среди таких генов: *box* – цитохрома *b*, *21S-pPHK*, *oxi 3* – 1-й субъединицы цитохромоксидазы I. Так при клонировании и секвенировании гена *box* выяснилось наличие в нем 6 экзонов и 5 интронов. При объединении первого и второго экзона и части второго интрона образуется мРНК, с которой транслируется фермент – РНК-матураза, предназначенный для удаления второго интрона при сплайсинге. В данном случае второй интрон является факультативным, поскольку он функционирует и как экзон. Таким образом, фермент сплайсинга закодирован в самом гене *box*.

Кроме того, на этом объекте обнаружено ранее неизвестное явление – *транспозиция интрона*. При скрещивании штаммов дрожжей с разным типом спаривания (w^+ с w^-) происходит перенос интрона из гена *21S-pPHK* родительского штамма w^+ в ген *21S-pPHK* другого родительского штамма w^-.

Причем интрон в гене *21S-рРНК* функционирует как ген, кодирующий сайтспецифическую эндонуклеазу – фермент, необходимый для переноса интрона. Следствием этого события является превращение митохондрий штамма с типом спаривания *w* в – *w*⁺.

15.2.4. МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА

Геном митохондрий человека представлен кольцевой двухцепочечной молекулой ДНК, содержащей 16559 п.н. (см. рис. 15.6). Доля митохондриальной ДНК от обще-

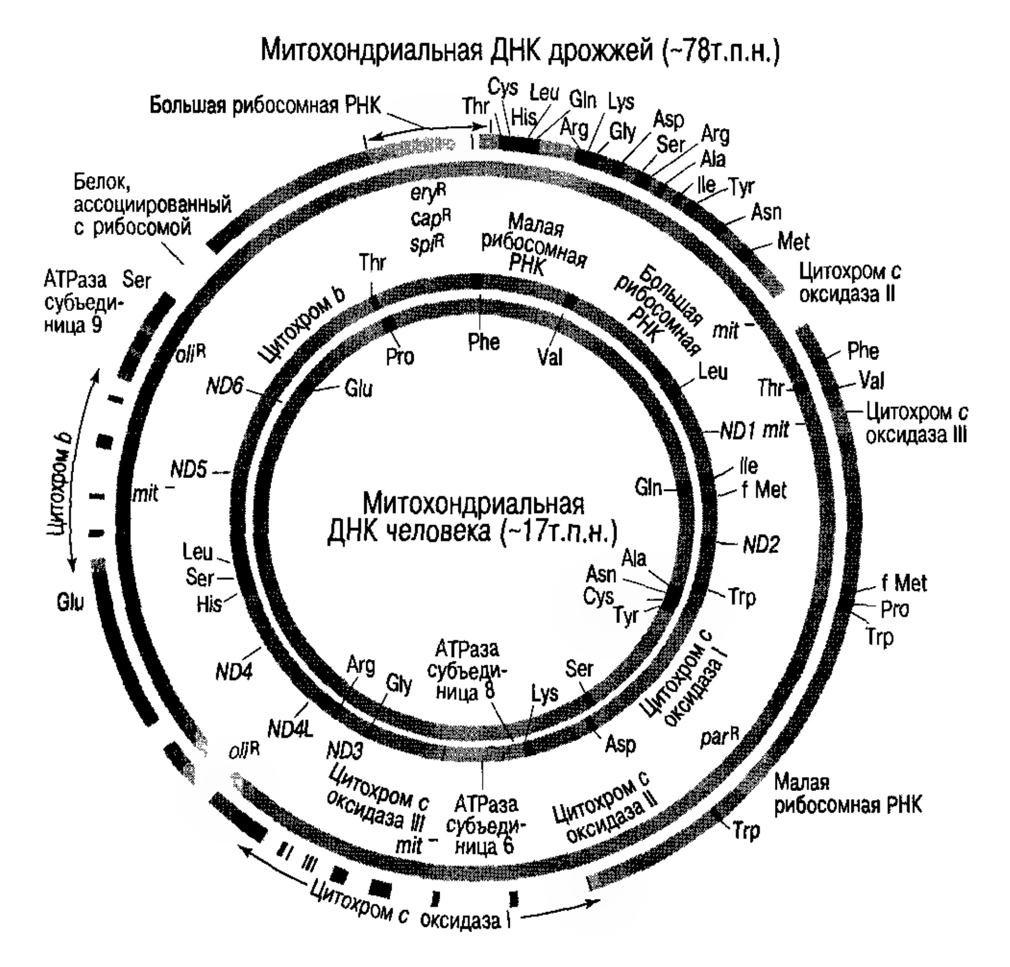


Рис. 15.6. Карта мтДНК (mt DNAs) дрожжей и человека. (По: Griffiths et al., 2002)

Каждая карта представлена двумя кольцами, соответствующими двум цепям ДНК-спирали. Гены тРНК показаны по аббревиатуре аминокислот. ND-гены кодируют NADH-дегидрогеназу.

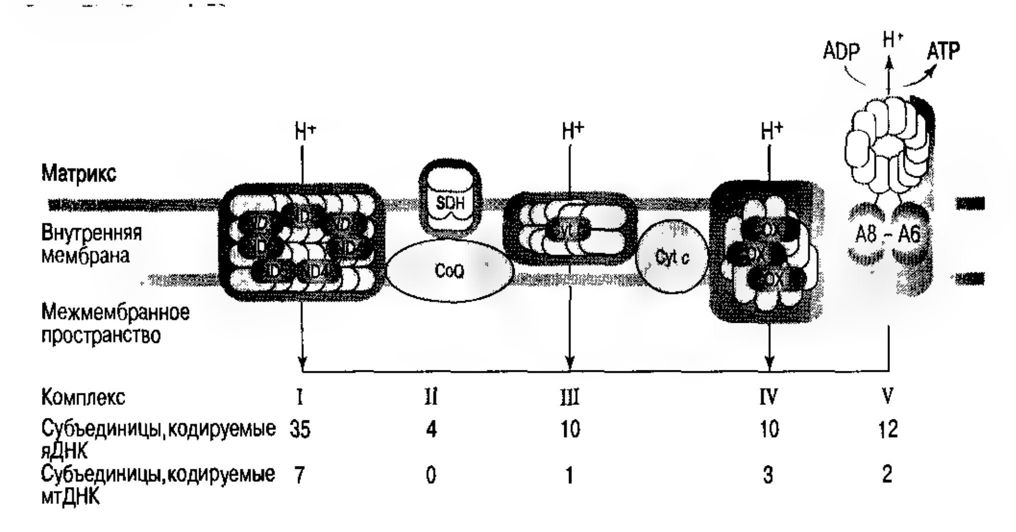


Рис. 15.7. Митохондриальная дыхательная цепь. (По: Griffiths et al., 2000)

Число субъединиц указано под стрелками. Протоны H^+ перекачиваются из матрикса в межмембранное пространство с помощью комплексов I, III, IV. Возвращение в матрикс осуществляется комплексом V (АТР-синтетазы) и сопровождается образованием АТР. Коэнзим Q10 (CoQ) и цитохром с (Cyt c) - протеины, кодируемые яДНК. ND-NADH-дегидрогеназа; SDH - сукцинатдегидрогеназа; COX цитохромоксидаза; А6 и А8 - субъединицы АТР-синтетазного комплекса, кодируемые мтДНК

го количества ДНК достигает 5%. Митохондриальная молекула ДНК состоит из тяжелой (Н) и легкой (L) – цепей. Цепи различаются по нуклеотидному составу. Н-цепь (heavy) содержит больше пурина, легкая L-цепь (light) – больше пиримидина. Митохондриальный геном человека, как и других организмов, представляет собой полуавтономную генетическую систему. Большая часть генов человека локализована в хромосомах ядра, и меньшая - в митохондриальном геноме (рис 15.7). В состав генома митохондрий входят:

- гены рибосомных 12S-рРНК и 16S-рРНК,
- 22 гена тРНК,
- гены трех субъединиц цитохром-*c*-оксидазы,
- шестой и восьмой субъединиц АТРазы,
- ген цитохрома *b*
- гены семи субъединиц NADH -дегидрогеназы.

Из этих генов в легкой цепи локализован только ген 6-й субъединицы NADH-дегидрогеназы – *ND6* и 8 генов тРНК. В Н-цепи мтДНК есть некодирующий район – D-петля (от англ. *displacement loop*). Этот район содержит участки, отвечающие за процессы инициации репликации и транскрипции: точку инициации репликации (O_H), сайты связывания транскрипционного фактора mtTF, промотор легкой цепи (P_L), два промотора тяжелой цепи (P_{H1} и P_{H2}). Размер этого района 1122 п.н., на генетической карте он расположен между генами *тРНК*^{про} и *тРНК*^{фен}. В районе D-петли, а также в *V-области*, расположенной между генами лизиновой тРНК и геном цитохромо-

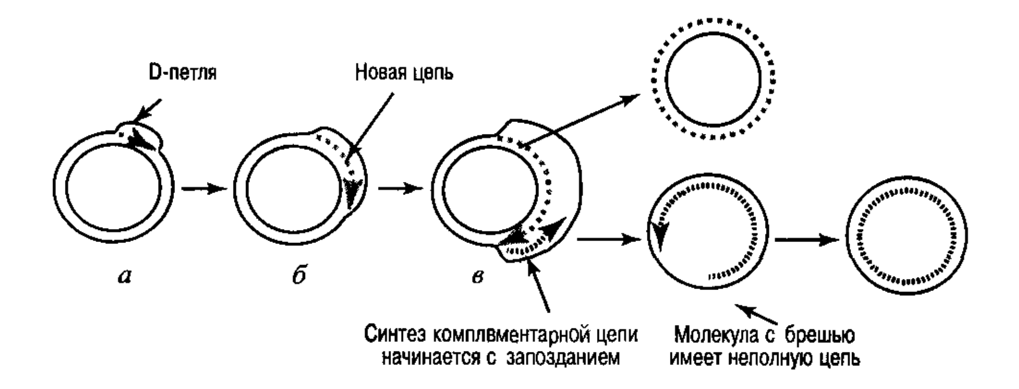


Рис. 15.8. Репликация митохондриальной ДНК у млекопитающих. (По: Зенгбуш, 1982; Льюин, 1987).

Образование D-петли (а), начало синтеза Н-цепи (б), репликация L-цепи (в), окончание синтеза дочерних молекул мтДНК

ксидазы II, находятся участки, в которых наиболее часто выявляются однонуклеотидные замены, делеции и инсерции.

Митохондрии делятся простым делением. Репликация мтДНК происходит с образованием D-петли на тяжелой цепи. Точка начала репликации тяжелой цепи (O_H) находится в районе 110-441 нуклеотида, а легкой цепи (O_L) – 5721-5798. Репликация на тяжелой и легкой цепи происходит от своих точек инициации в разных направлениях и в разное время (рис. 15.8).

Такой тип репликации нельзя назвать универсальным для всех эукариот. Например, у морских ежей после образования D-петли репликация одновременно начинается на обеих цепях, и при этом наблюдается несколько точек инициации репликации. В линейной митохондриальной ДНК *Tetrahymena* (ресничной инфузории) обнаружено 6 петель, и репликация идет в двух направлениях.

Митохондрии, как в зиготе, так и в соматических клетках, имеют в основном материнское происхождение. Отсюда понятен неменделевский характер наследования. Полностью материнский тип наследования возможен только в том случае, если единичные отцовские митохондрии или не попадают в зиготу или их деление заблокировано. При отсутствии отцовских митохондрий невозможен и кроссинговер между родительскими молекулами мтДНК и образование новых комбинаций митохондриальных генов.

Транскрибируются и затем транслируются обе цепи мтДНК. При транскрипции мтДНК человека образуется единый транскрипт, в котором расщепление происходит по сайтам, расположенным по обе стороны от каждого гена тРНК (рис. 15.9). После вырезания молекул тРНК высвобождаются молекулы рРНК и мРНК. При этом большая часть генов тРНК (14 из 22) транскрибируется по часовой стрелке. При возникновении мутаций в мтДНК в клетке наблюдается **гетероплазмия** – присутствие различных мтДНК. При **гомоплазмии** все мтДНК в клетке одинаковые. Мутации,

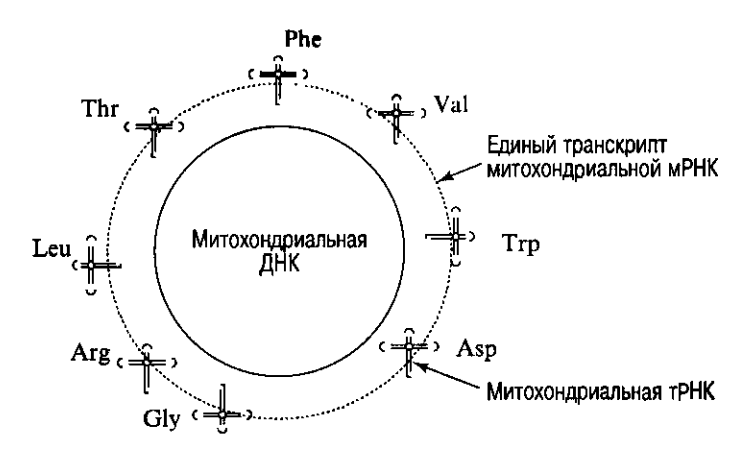


Рис. 15.9. Транскрипция мтДНК человека. (По: Льюин, 1987)

Из единого транскрипта вырезаются молекулы тРНК (некоторые показаны на карте), освобождая молекулы рРНК и мРНК.

возникающие в мтДНК человека (в основном точковые мутации и делеции), приводят к изменению белков, входящих в комплексы дыхательной цепи митохондрий, и, как следствие, к снижению энергетического обеспечения клеток. Недостаток синтеза молекул АТР приводит к заболеваниям тех тканей и органов, в которых происходят энергоемкие процессы.

Изучение особенностей структуры и функционирования ДНК цитоплазматических органелл в норме и при патологии – не единственная научная задача. Анализ мтДНК проводится и в популяционных исследованиях. В митохондриальной ДНК выявлены участки, по которым наиболее часто наблюдается полиморфизм, т.е. различия в нуклеотидной последовательности. Полиморфизм мтДНК широко используется для установления степени дивергенции между разными популяциями человека. В 1980-1990-х годах, благодаря интенсивным популяционно-генетическим исследованиям, получена обширная информация об изменчивости мтДНК человека. Так в исследованиях Э.К. Хуснутдиновой и соавторов выявлены основные расовые и популяционно-специфические типы мтДНК среди народов Волго-Уральского региона. Многокопийность мтДНК делает их удобным объектом при анализе старого биологического материала, в котором ядерная ДНК, как правило, деградирована. В частности, анализ мтДНК был использован при идентификации «Екатеринбургских останков», предположительно принадлежащих последнему русскому императору Николаю II и членам его семьи.

15.2.5. О ПРОИСХОЖДЕНИИ МИТОХОНДРИЙ

В научной литературе активно обсуждается гипотеза о прокариотическом происхождении митохондрий у эукариот. По этому вопросу существуют различные точки зрения.

С одной стороны митохондрии действительно имеют прокариотические черты:

- геном митохондрий небольшой, как и у прокариот;
- ДНК, как правило, имеет кольцевую форму;
- в митохондриальных генах человека есть общий промотор и один полицистронный транскрипт, как в оперонах прокариот;
- инициаторной тРНК является тРНК^{фмет};
- нет ядра, ограниченного ядерной мембраной;
- митохондриальные гены человека не имеют интронов;
- константы рибосом в митохондриях человека – 55S, большая субъединица имеет константу 39S, а малая 28S, в то время как соответствующие эукариотические константы: 80S, 60S и 40S.

С другой стороны, у митохондрий эукариотических организмов, особенно у дрожжей и растений, с большим, чем у млекопитающих размером молекулы ДНК, есть и *эукариотические черты:*

- в некоторых генах, кодирующих белки и тРНК, есть интроны;
- в генах растений есть промоторные области;
- митохондриальные гены растений транскрибируются на моноцистронные мРНК за исключением рибосомных генов;
- при наличии интронов в гене происходит сплайсинг;
- мРНК человека, транскрибированная с мтДНК, хотя не кэпируется, но полиаденилируется;
- мтДНК не имеет последовательности Шайна–Дальгарно;
- копийность молекул ДНК в митохондриях не является характерной чертой для прокариотических геномов.

Кроме того, большая часть генов, кодирующих митохондриальные белки, локализована в хромосомах ядра, часть гибридных белков находится под двойным контролем со стороны ядерных и цитоплазматических генов. Сторонники прокариотического происхождения митохондрий считают вполне вероятным перенос части митохондриальных генов в хромосомы ядра. Возникает вопрос: как эти гены могли попасть в ядро? У человека кроссинговер не происходит даже между собственными митохондриальными генами, не то, что между хромосомными генами и генами мтДНК. Кроме того, митохондриальный геном настолько мал, что он не мог исходно включать такое большое количество генов. К тому же гены, которые находятся в ядре, имеют эукариотическую экзон-интронную структуру и экспрессируются по законам эукариотической клетки.

Вряд ли можно считать вероятным создание эукариотических клеток без митохондрий, если без энергетического обеспечения они существовать не могут. У человека в случае мутаций в мтДНК и накопления числа дефектных митохондрий в клетке выше порогового уровня возникают тяжелые заболевания.

15.3. МАТЕРИНСКИЙ ЭФФЕКТ ЦИТОПЛАЗМЫ

Материнский эффект цитоплазмы заключается во влиянии генотипа матери на характер потомства первого поколения, передаваемый через свойства цитоплазмы яй-

цеклеток. В результате потомство развивается в значительной степени в соответствии с генотипом матери и независимо от особенностей собственного генотипа.

В чем причины материнского типа наследования, когда он не связан с проявлением генов митохондриальной ДНК?

Как известно, при формировании ооцитов в них накапливаются рибосомы, а также молекулы мРНК и различные структурные белки и ферменты. Все эти запасенные молекулы необходимы в тот период времени, пока не функционирует собственная белок-синтезирующая система в делящейся зиготе. У позвоночных до стадии гаструлы синтез белка происходит с материнских мРНК, а затем начинается экспрессия собственных генов зародыша. У дрозофилы из питающих клеток в ооцит попадают различные первичные продукты материнских генов. К генам с материнским эффектом относятся гены, контролирующие переднезаднюю полярность зародыша. К ним относятся *bicoid (bcd), nanos (nos), pumilio (pum), trunk (trk)* и др. Первичные продукты этих генов (РНК или белка) распределяются с различной концентрацией по длине яйца. Мутации генов с материнским эффектом, нарушая сегментарную структуру личинок дрозофилы, действуют как летали.

Материнский эффект характерен для наследования формы раковины (направления ее завитка) у прудовика *Limnaea peregra*. Ген *D* у прудовика *Limnaea peregra* определяет правозавитковость раковины, *dd* – левозавитковость. При разных направлениях скрещиваний *DD* × *dd* и *dd* × *DD* фенотип первого поколения определяется генотипом материнской формы. При скрещивании материнских правозавитковых прудовиков с отцовскимн левозавитковыми в первом поколении все моллюски имеют раковину, закрученную в правую сторону (рис. 15.10). При реципрокном направлении, напротив, у первого поколения проявляется материнский фенотип (левоза-

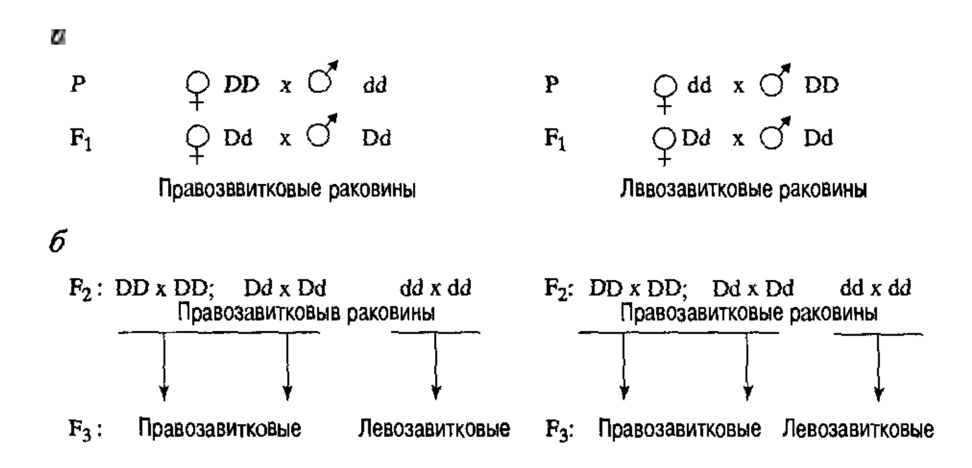


Рис. 15.10. Наследование формы раковины у прудовика

а – перекрестное скрещивание правозавиткоых и левозавитковых форм прудовика; *б* – результаты скрещивания при самооплодотворении D– × D– и dd × dd. (Запись D - означает, что генотип может быть как DD, так и Dd)

витковость). Таким образом, фенотип первого поколения зависит от того, под влиянием каких генов формируется цитоплазма яйцеклеток. Прудовик – гермафродит и скрещивание у него возможно как между разными особями, так и самооплодотворение. В случае самооплодотворения улиток первого поколения с генотипом *Dd* × *Dd* во втором поколении все улитки имеют раковину, закрученную в правую сторону вне зависимости от генотипа (*DD, Dd, dd*). Левозавитковые формы появляются уже в третьем поколении от скрещивания *dd* × *dd*. Как выяснилось, направление завитка раковины определяется положением веретена деления от средней линии при первых двух делениях зиготы.

Подводя итоги, остановимся еще на одном важном вопросе: в каких случаях можно предполагать нехромосомный тип наследования? На это указывают:

- отсутствие менделевского наследования (исходное положение);
- передача признака по материнскому типу вне зависимости от направления скрещивания;
- сохранение наследования признака по материнскому типу при замене хромосом женского организма на хромосомы мужского организма (цитоплазматическая мужская стерильность).

В клинической генетике диагностическими критериями митохондриального заболевания служат:

- аномальные структуры митохондрий, выявленные при морфологическом исследовании мышечных биоптатов («рваные красные мышечные волокна»);
- мутации (точковые мутации, делеции, дупликации) в мтДНК, обнаруженные в молекулярно-генетических исследованиях;
- повышение концентрации метаболитов (в крови и мышечных биоптатах), являющихся биохимическими маркерами нарушения окислительного фосфорилирования;
- изменение активности ферментов дыхательной цепи митохондрий в мышечном биоптате больных (дефицит дегидрогеназы, цитохром-*c*-оксидазы и др.).

Таким образом, генетическая система эукариот состоит из двух подсистем: *нуклеотипа* и *цитотипа*. Эти две системы, занимающие разные компартменты клетки, имеют различную весовую категорию. Бесспорно, главную роль играет ядро и по количеству генов и по их значимости для функционирования клетки и организма. Однако без митохондриальной и хлоропластной ДНК, которые принимают участие наряду с ядерными генами в кодировании белков и ферментов, обеспечивающих получение энергетической молекулы АТР, биохимическая фабрика клетки функционировать не может. Белок-синтезирующая система митохондрий и хлоропластов обладает определенной степенью автономности, поскольку в мтДНК и хлДНК имеются гены рРНК, тРНК и гены немногих рибосомных белков. В цитоплазматических органеллах имеются собственные рибосомы, однако большинство рибосомных белков и все факторы трансляции кодируются ядерными генами. Белки, участвующие в биосинтезе АТР находятся под двойным контролем – хромосомных и цитоплазматических генов. Мутации как ядерных, так и хлоропластных и митохондриальных генов, нарушающих функционирование цитоплазматических органелл, приводят к снижению энергетического обеспечения клеток и, как следствие, к проявлению мутантного фенотипа. У человека мутации мтДНК вызывают болезни нервной системы, зрительных нервов, сердечной и скелетных мышц.

Глава

16 ГЕНЕТИКА И ОНТОГЕНЕЗ

Онтогенез многоклеточных (Metabiota) представляет собой удивительный по сложности и стройности комплекс ростовых и формообразовательных процессов, в результате которых развившийся из зиготы организм наследует соответствующие видоспецифические и индивидуальные черты организации, физиологии, а в случае человека – и психики.

При этом различают ростовые процессы на клеточном уровне (увеличение количества клеток в результате делений, увеличение клеточного объема) и морфогенез (формообразование), включающий как рост, так и локальную гибель клеток; изменение их формы; движения и изгибы клеточных пластов и многое другое. То, что индивидуальное развитие организма находится под генетическим контролем, доказывается фактом существования наследственной изменчивости по всем рассматриваемым процессам. Так, выявлены мутации генов, контролирующих скорость первых делений дробления, обнаружены онкогены, регулирующие ростовые процессы, известно множество мутаций генов, ответственных за становление морфологических признаков организма в ходе онтогенеза. Современные исследования онтогенеза многоклеточных на молекулярном уровне весьма обширны, но на вопрос, как из двух клеток (яйцеклетки и спермия) развивается организм, представленный практически двумя сотнями гистотипов клеток, точного ответа пока нет. Как говорил Н.В. Тимофеев-Ресовский: «...почему в процессе развития Metabiota в должное время в должном месте происходит должное?». Это был и есть главный вопрос теории онтогенеза.

Первые попытки ответить на него восходят еще к средним векам, когда оформились две основные теории:

1. **Преформизм.** Сторонники этой теории утверждали, что развития как такового нет, и каждый индивид представляет собой, грубо говоря, матрешку, т.е. его развитие – это развертывание и рост уже содержащихся в яйцеклетке или спермии специфических микроструктур. Согласно А. Галлеру и Ш. Боннэ, в каждой яйцеклетке содержится полностью сформированный зародыш, и каждый такой зародыш имеет яичник с яйцеклетками, в которых в свою очередь содержатся еще меньшие зародыши. По подсчетам А. Галлера, в яичнике Евы должно было содержаться около 200 млрд. зародышей.

2. **Эпигенез.** Сторонники этой теории полагали, что внутренний механизм развития отсутствует, в исходной клетке ничего нет, все появляется в процессе взаимодействия со средой. Они настаивали на том, что организм в целом и отдельные органы в частности по мере развития не просто увеличиваются в размерах, но и усложняются. К.М. Бэру принадлежит детальное описание развития куриного эмбриона как строго упорядоченного процесса последовательных изменений от яйца к зародышу и далее к зрелой особи.

Хотя ясно, что теория эпигенеза во многих отношениях более корректна, чем взгляды преформистов, но даже в 70-х годах XX века некоторые исследователи отрицали генетическую регуляцию индивидуального развития, полагая, что геном только сопутствует развитию, а не определяет его. Тем не менее, и эпигенез, и преформизм вкупе имеют рациональное зерно: развитие многоклеточных может быть представлено как преформированный эпигенез, или эпигенетическая преформация.

Зигота действительно не содержит никакого предварительно сформированного зародыша. От родителей потомству достается ряд «указаний» в виде заключенной в ДНК генетической информации, которая во взаимодействии с окружением направляет ход развития организма.

Содержат ли все соматические клетки одинаковый набор генов? Или эти наборы различаются? Вильгельм Ру, один из создателей ядерной теории наследственности, предположил, что ядра, возникающие при дроблении зиготы, разнокачественны, а дифференцировка клеточных функций представляет собой результат расхождения в разные клеточные ядра качественно различного наследственного материала. Согласно его теории, сформулированной в современных терминах, каждая клетка содержит в своем ядре только те гены, которые необходимы для программирования характерных для нее функций. Специализация в развитии будет, таким образом, результатом постепенного формирования мозаики клеток, содержащих различные части генома.

Однако его современник Г. Дриш, проверяя в эксперименте гипотезу о том, что у Metabiota ядро каждой живой клетки содержит тот же самый геном, что и ядро зиготы, показал, что перемещение ядер между клетками эктодермы и мезодермы дробящегося зародыша не нарушает его нормального развития. Зачаток регенерирующего хвоста тритона может быть пересажен в область конечности и превратится в ногу, а не в хвост. Следовательно, дробление и последующая дифференцировка не сопровождаются утерей или необратимыми изменениями ядерного материала.

Тотипотентность дифференцированных соматических клеток, т.е. их способность обеспечивать полное развитие организма свойственна и животным, и растениям. Одно из наиболее прямых доказательств этого факта – опыты английского генетика Дж. Гердона по трансплантации ядра из дифференцированной соматической клетки в безъядерную зиготу (рис. 16.1). Используя африканскую шпорцевую лягушку *Xenopus laevis,* он получил взрослых особей на основе генетической информации ядра соматической клетки. Путем облучения большими дозами УФ из неоплодотворенных яиц функционально удалялось ядро; затем в каждое из энуклеированных яиц вводили дифференцированное ядро из клетки кишечного эпителия головастика, и таким способом инициировали развитие. В ряде случаев из подобных яиц развивались головастики, а затем и взрослые лягушки.

Для доказательства того, что в развитии участвовало именно трансплантированное, а не собственное ядро яйцеклетки (выжившее при УФ-облучении), применяли генетическое маркирование. Для выделения яйцеклеток использовали линию, характеризующуюся наличием в ядре двух ядрышек – по одному на каждый ядрышковый организатор двух гомологичных хромосом. Ядро соматической клетки было получено от особи, гетерозиготной по делеции ядрышкового организатора и потому имеющей в ядре только одно ядрышко. Все лягушки, развившиеся в результате пе-

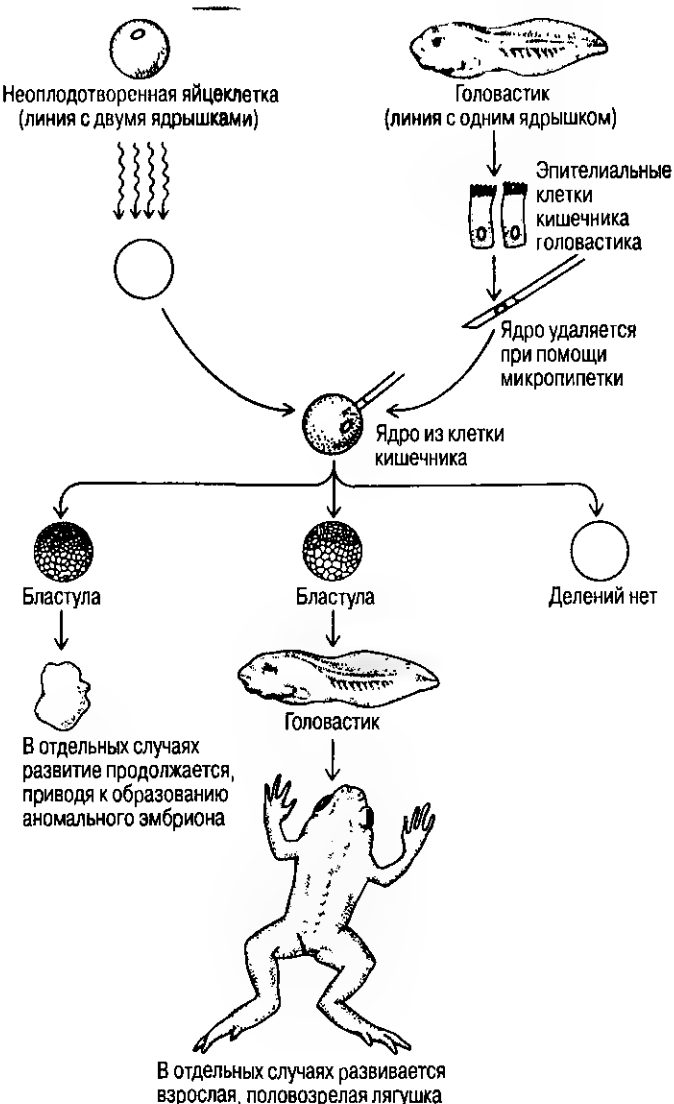


Рис. 16.1. Схема опытов Дж. Гердона, демонстрирующих тотипотентность ядра дифференцированной клетки. (Из: Айала и Кайгер, 1988)

ресадки ядер, имели по одному ядрышку. Несколько взрослых лягушек из их числа достигли половозрелости, и оказались вполне фертильными, как и нормальные *Xenopus*.

Эти эксперименты показали, что дифференцировка клеток в онтогенезе не обязательно сопровождается необратимой инактивацией генетического материала ядра, ядро соматической клетки с репрессированной большей частью генома может претерпеть дерепрессию, если его трансплантировать в ооплазму оплодотворенной яйцеклетки, способной к реализации полного цикла развития.

экспериментах нескольких типов было доказано, что вся информация, необхо- для нормального развития, присутствует в ядре дифференцированной клетки жет быть вновь активирована и использована для повторения процесса разви- Таким образом, проблема генетического контроля индивидуального развития шла в рамки проблемы дифференциальной экспрессии генов, которая может сходить на уровне любого известного матричного процесса. Концепция диффе- иальной активности генов была выдвинута в начале 30-х годов XX в. Т. Морга- Согласно этой концепции во всех клетках организма имеется одинаковый на- енов, но функционируют они в различно дифференцированных клетках по-раз- . В настоящее время дифференциальная активность генов в клетках и тканях разной ализации и на разных этапах онтогенеза – это экспериментально установленный универсального значения: в каждом данном типе клеток одновременно экспресси- я лишь небольшая доля генов, и спектры экспрессирующихся генов в клетках раз- типов весьма специфичны.

Очевидно, различные регуляторные сигналы, обеспечивающие «включение» и ключение» генов, представляют собой важную составную часть механизма диф- нцировки клеток, которая происходит на основе детерминации определенного очного типа. Хотя накопленные знания все еще не позволяют полностью предста- себе картину онтогенеза, некоторые ее фрагменты и связи между ними уже ясны.

16.1. ЭТАПЫ ОНТОГЕНЕЗА

витие сомы состоит из трех процессов: детерминации, дифференцировки и мор- енеза.

Детерминация представляет собой процесс приобретения клетками эмбриона необра- ых в норме отличий от клеток-предшественников. Это установление функционально- состояния, ведущего к определенному направлению развития, т.е. это своеобразная ытая дифференцировка: клетки что-то о себе уже «знают», но «не сообщают».

Дифференцировка – этап онтогенетической дивергенции, который происходит на нове предшествующей детерминации (латентной дифференцировки) клеток к оп- еленному пути развития. Детерминация представляет собой процесс последова- ьных ограничений онтогенетических потенций эмбриональных клеток. Каждый средной уровень детерминации устанавливается в компактной группе клеток и на- едуется их клональными потомками. Геноконтролируемый процесс детерминации еток особенно полно изучен у *Drosophila melanogaster*.

И, наконец, из диффереицированных клеток строятся определенные морфемы – ганы, т.е. происходит *морфогенез.*

16.1.1. ДЕТЕРМИНАЦИЯ

Состояние детерминации, наследуемое при митотических делениях клетки, луч- е всего изучено у дрозофилы, так как у нее (как и у других насекомых) детермина- ия и дифференцировка имагинальных структур разобщены во времени вследствие

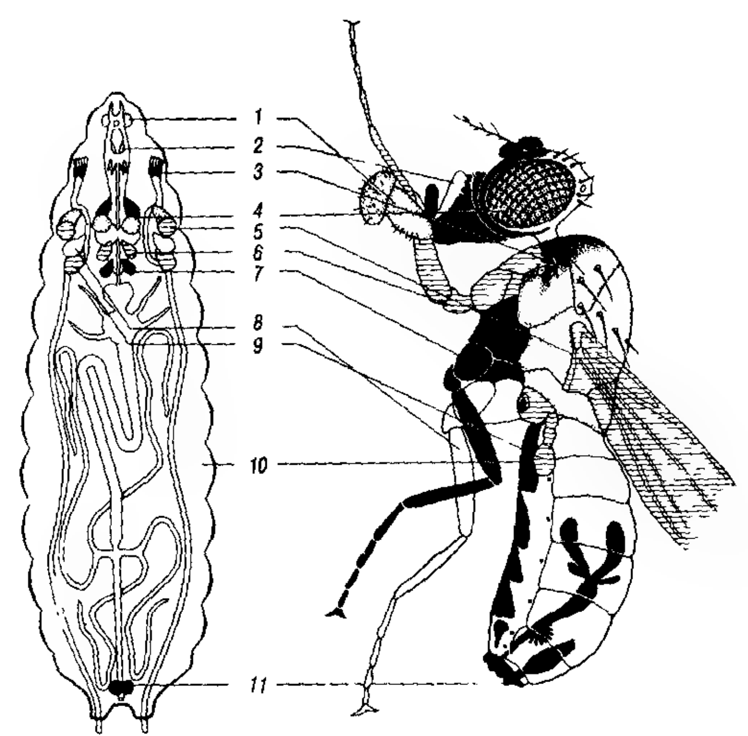


Рис. 16.2. Имагинальные диски зрелой личинки дрозофилы и развивающиеся из них структуры имаго. (Из: Айала и Кайгер, 1988)

Абдоминальные тергиты и стерниты развиваются из зачатков меньшего размера, обозначенных на рисунке слева точками.

протекающего в два этапа развития с полным циклом превращения. По меткому замечанию И. Швинка, развитие насекомых можно представить как два эмбриогенеза. Кратко их суть такова.

Вслед за оплодотворением ядро зиготы у дрозофилы, а затем и дочерние ядра проходят несколько синхронных митотических делеиий, формируя синцитий с ядрами в общей цитоплазме. И только после 10–12 делений дочерние ядра мигрируют в кортикальный слой и обособляются в самостоятельные клетки, формирующие бластодерму. Эти клетки, число которых около 6000, уже детерминированы к различным направлениям развития. Из бластулы образуется гаструла, происходит органогенез, и из яйца выходит личинка, имеющая два типа клеток: личиночные (они не делятся, а только увеличиваются в размерах) и имагинальные. Последние, выделившись из окружающих тканей на стадии бластодермы в виде так называемых *имагинальных дисков*, в течение всего эмбрионального периода находятся в покое. В личиночном периоде диски не только растут, но и приобретают характерную для каждого из них форму. Имагинальные диски уже детерминированы к развитию различными путями, в их ядрах резко возрастает уровень транскрипционной активности. В период окукливания под влиянием гормонов метаморфоза имагинальные диски дифференцируются и дают начало разным органам взрослого насекомого–имаго (рис. 16.2). Из пары глазных дисков образуются глаза и значительная часть головной

капсулы, из антенных – пара антенн, максиллярных щупиков и другая часть головной капсулы. Пара лабиальных дисков дает начало нижней губе и хоботку, а клипеолабральных – части верхней губы и парусу. Из трех пар вентральных торакальных дисков развиваются соответственно первая, вторая и третья пары торакальных ног с небольшими прилежащими участками торакса. Тремя парами представлены и дорсальные торакальные диски. Из первой образуется пара гумерусов, из второй – пара крыльев, из третьей – пара жужжалец и торакс. Кроме перечисленных парных дисков, личинка имеет непарный мужской либо женский генитальный диск, дающий начало соответствующим структурам у имаго.

Наследуемость состояния детерминации при митотических делениях подтверждается в опытах по пересадке имагинальных дисков в брюшко взрослой мухи. При этом дифференцировка имагинальных дисков не происходит. Если после серии таких последовательных пассажей имагинальный диск пересадить в полость тела личинки, готовой к окукливанию, то взрослая муха будет иметь в брюшной гемолимфе дополнительный орган: глаз, крыло, ногу и т.д. в соответствии с тем, какой имагинальный диск был взят исходно.

Целый ряд данных указывает на то, что детерминация клеток зачатков личиночных и имагинальных органов различных сегментов тела дрозофилы происходит во время образования клеточной бластодермы или сразу после того.

Во первых, клетки, изолированные из передней области бластодермы, дают начало только структурам передней части тела взрослой мухи, а из клеток задней области бластодермы формируются только структуры задней части тела имаго.

Во-вторых, удаление клеток из определенных участков поверхности бластодермы приводит к специфическим повреждениям взрослого насекомого, развившегося из поврежденного эмбриона, т.е. положение клеток в бластодерме определяет судьбу этих клеток в течение всего процесса развития.

Наконец, исследование гинандроморфов дрозофилы (особей, возникающих, например, в том случае, когда одно из эмбриональных ядер утрачивает Х-хромосому, и клетки с потомками этого ядра становятся мужскими – ХО; подробнее о гинандроморфах см. гл. 8) показало, что делящиеся ядра проходят детерминацию в соответствии со своим положением на поверхности яйцеклетки. Маркирование Х-хромосомы этих мух (являющихся наполовину самками, наполовину самцами) с помощью мутаций, изменяющих строение щетинок, а также цвет кутикулы или глаз, дает возможность наблюдать визуально линию раздела между мужскими и женскими клетками, проходящую по телу мухи.

Т.Г. Морган точку начала индивидуального развития дрозофилы относил на период созревания яйцеклетки. Дальнейшие исследования доказали правильность такой постановки вопроса, так как на этой стадии была выявлена экспрессия практически всех генов, присущих данному виду, даже тех, активность которых станет необходимой на более поздних стадиях развития.

16.1.1.1. ООПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ СЕГРЕГАЦИЯ

Созревание ооцита развертывается как строго направленное, последовательное формирование гетерогенности его цитоплазмы, получившее наименование ооплазмати-

ческой сегрегации – процесса, в ходе которого намечается план строения будущего организма. Этот план материализуется на основе градиентного распределения биологически активных веществ, доказательством чего, в частности, является постепенное падение концентрации РНК и белков в направлении от анимального полюса к вегетативному. Если экспериментально разрушить анимально-вегетативный градиент (например, центрифугированием) и добиться равномерного распределения РНК, белков и других веществ в цитоплазме, то развитие зародыша останавливается в самом начале. При другом типе разрушения – расчленении существующего в ооците дрозофилы анимально-вегетативного градиента на 2 самостоятельных, возникает зародыш с двумя системами осевых органов.

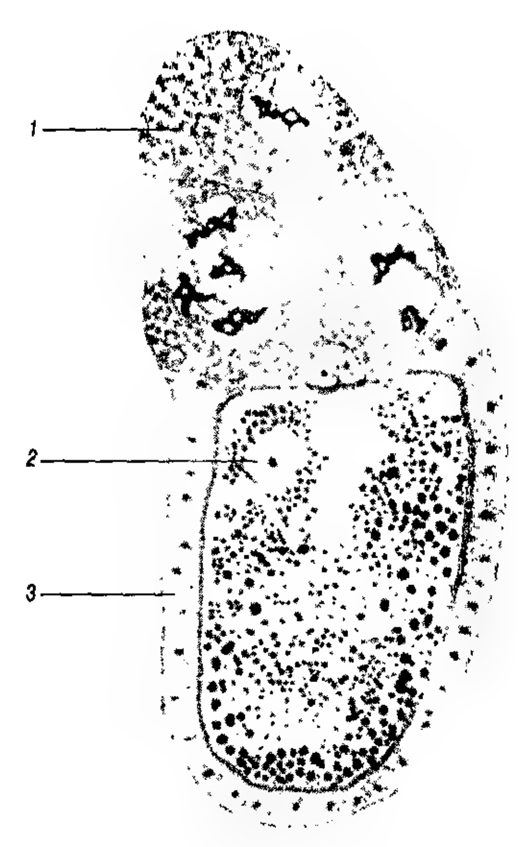


Рис. 16.3. Созревание яйца дрозофилы. (Из: Coming & King, 1969)

Стадия S10. 1 – питающие клетки (трофоциты); 2 – кариосома в яйцеклетке; 3 – фолликулярные клетки.

Ооплазматическая сегрегация обусловлена положением ооцита в материнском организме. Яйцо дрозофилы созревает в особой камере – фолликуле (рис. 16.3). Из одного оогония в результате четырех делений, характеризующихся высокой степенью упорядоченности, формируются 16 клеток, которые остаются связанными друг с другом кольцевыми каналами. Ооцитом становится та клетка, которая занимает задний конец яйцевой камеры. Остальные 15 превращаются в огромные питающие клетки. Именно в них активны так называемые гены с материнским эффектом, т.е. функционирующие в организме матери еще до оплодотворения яйца: *bicoid, exuperantia, swallow, nanos и pumilio.* Их взаимоотношения подробно разбирались в гл. 5. При экспериментальном изучении транспорта мРНК-транскрипта гена *bicoid,* показано наличие для нее четко выраженного анимально-вегетативного градиента: мРНК гена *bicoid* накапливается тем концом ооцита, который должен стать передним полюсом эмбриона. Все пять вышеперечисленных генов составляют систему, обеспечивающую формирование передне-заднего градиента. Продукты этих генов принято называть **морфогенами.** Помимо них, важную роль в формировании плана строения будущего организма дрозофилы играет ген *hunchback*, активно функционирующий не только в материнском геноме, но и у зиготы. Мутанты, гомозигот-

ные по *hunchback*, летальны и схожи с мутантами *bicoid* по утрате передних структур. Продукт гена *hunchback* блокирует развитие хвостового конца, чему в ходе нормального развития противостоит продукт гена *nanos*, локализующийся у заднего полюса яйца.

Кроме того, в ооците существует система, контролирующая формирование дорсо-вентрального градиента. Она включает функционирующие в фолликулярных клетках гены *torpedo*, *pipe*, *nudel*, *windbeutel*, в результате чего происходит обмен не идентифицированными сигналами между фолликулярными клетками и вентральной областью ооцита. После оплодотворения экспрессируются шесть генов, из которых *snake* и *easter*, кодирующие сериновые протеазы, активируют ген *spatzle*. Но ведущая роль в детерминации дорсо-вентральной полярности принадлежит гену *toll*, активность которого, опосредованная генами *pelle* и *cactus*, обеспечивает формирование градиентного распределения белкового продукта гена *dorsal*, действующего как фактор транскрипции.

Наконец, третья система, состоящая из генов *torso*, *tailless* и *huckebein* осуществляет общий контроль над формированием градиентов при развитии несегментированных головного и хвостового конца. Причем в детерминации их анатомических границ особое значение имеет белок гена *torso*, расположенный на обоих полюсах яйца.

Таким образом, еще до формирования зиготы продукты материнских мРНК распределяются вдоль будущей оси эмбриона дрозофилы неравномерно, создавая определенные градиенты разных морфогенов. Что касается ооцитов млекопитающих, то столь жестко фиксированная гетерогенность, по-видимому, им не свойственна. Так, согласно отдельным экспериментальным данным, в ооцитах мыши эмбриональные оси устанавливаются только с момента развития зиготы. Однако делать какие-либо заключения можно будет только после обнаружения продуктов генов, гомологичных описанным у дрозофилы.

16.1.1.2. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ СЕГМЕНТАЦИИ

Процесс сегментации организма, включающий в себя разделение на головной, грудной, брюшной, а также производные от них отделы, является универсальным в животном мире. Избрав в качестве модельного объекта развития *D. melanogaster*, рассмотрим сначала присущие именно ей детали, представленные на рис. 16.4.

Первый этап становления пространственной организации регулируется генами с материнским эффектом, продукты активности которых в ходе оогенеза образуют градиенты с морфогенетически активными белками. Вслед за этим происходит оплодотворение и дробление зародыша. После образования бластодермы и включения зиготических генов начинается последовательное формирование сегментарного плана строения тела дрозофилы, личинки и взрослые особи (имаго) которой состоят из передних головных, трех грудных и восьми брюшных сегментов.

В результате взаимодействия перекрывающихся градиентов морфогенетически активных белков, являющихся продуктами генов *bicoid* и *nanos*, активируются гены группы *gap* (от англ. *gap* – брешь, дыра), разделяющие зародыш на широкие домены.

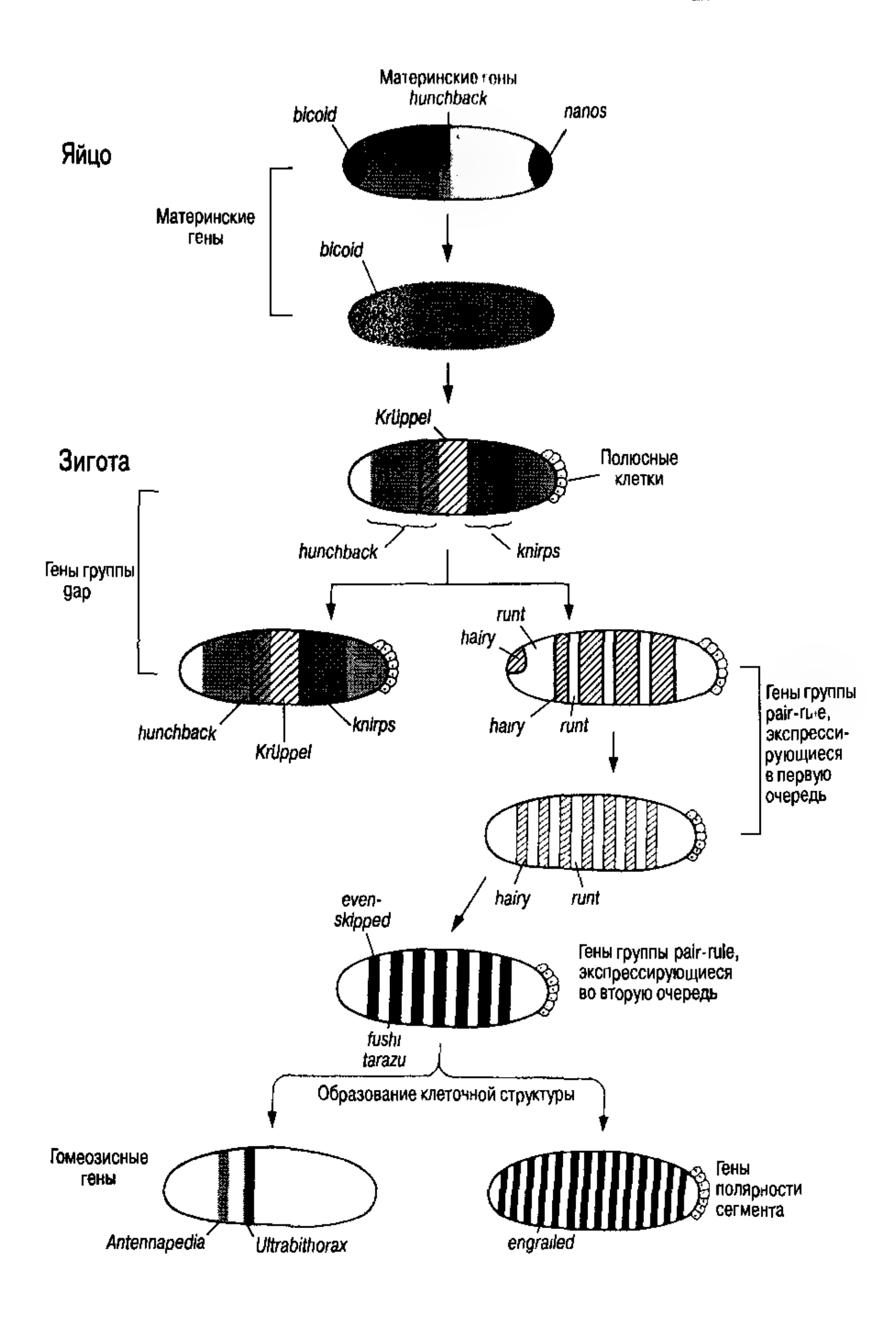


Рис. 16.4. Последовательная активация генов в онтогенезе дрозофилы. (По: Сингер, Берг, 1998)

настоящему времени описано 6 генов из группы gap, к числу главных следует отести гены *hunchback*, *Kruppel* и *knirps*. Каждый из них экспрессируется в определенных сегментах эмбриона. Экспрессия гена *hunchback* происходит в двух областях: в ццней четверти яйца, а также в пространстве от переднего полюса почти до середиы яйца. Ген *Kruppel* экспрессируется в широкой зоне, составляющей середину эмбиона. Продукт гена *knirps* выявляется как спереди, так и сзади от этой зоны. Тот акт, что экспрессия названных трех генов регулируется продуктами генов *bicoid* и *mos*, был установлен в результате изучения мутантов, не способных к их синтезу. оказано, что белок гена *bicoid*, действуя как позитивный регулятор экспрессии ге- *hunchback*, способствует накоплению продукта последнего у головного конца эмриона, а белок гена *nanos*, вероятно, ингибирует активность продукта гена *hunchck*. Кроме того, блокируя экспрессию гена *Kruppel* в передней и задней областях ибриона, белковые продукты генов *bicoid* и *nanos* способствуют накоплению мРНК на *Kruppel* в центральной части эмбриона. Поначалу размытые границы транснипционных областей генов группы *gap* с течением времени сужаются, так как беж гена *Kruppel* ингибирует транскрипцию гена *hunchback*, а продукты генов *hunchck* и *knirps* — транскрипцию гена *Kruppel*. Таким образом, области стабильной экссессии *gap*-генов сначала дифференциально регулируются материнскими детерминтами, а затем взаимной репрессией последних и собственно генов группы *gap*.

Продукты активации генов *gap* запускают функционирование группы *pair-rule*, состоящей из восьми генов и обусловливающей подразделение зародыша на более мелкие доли, состоящие из двух так называемых парасегментов. Причем, в одном из парасегнтов гены из группы *pair-rule* активны, а в другом нет. Из группы *pair-rule* у дрозофи в первую очередь экспрессируются гены *runt* и *hairy*, во вторую — *fushi tarazu* (редуктор тела сегментов) и *even-skipped* (редуктор четных сегментов).

Периодическая смена уровней экспрессии генов группы *pair-rule* приводит к лоольной экспрессии генов самой многочисленной группы — сегментарной полярости. Под действием их продуктов зародыш становится разделенным по всей проольной оси на окончательные сегменты. Для нас наибольший интерес из этой групы представляет ген *hedgehog*, для которого у позвоночных, в частности, у человека ть четко установленный гомолог.

Такова иерархическая последовательность функционирования трех основных упп сегрегационных (т.е. ответственных за количество сформированных сегменв) генов.

Как уже указывалось, мутации генов с материнским эффектом фенотипически оявляются у дрозофилы в виде нехватки или удвоения головных, хвостовых, дорльных или вентральных структур. Следствием мутаций других трех групп генов бут соответственно: 1) нарушение числа и полярности сегментов; 2) нарушение форрования половины сегментов: либо четных, либо нечетных; 3) утрата части каждосегмента с одновременным удвоением такой же части с противоположной стороны.

В настоящее время установлено, что у млекопитающих есть, по крайней мере, и гомолога морфогена *hedgehog* из группы генов сегментарной полярности: *Sonic HH), Desert (DHH)* и *Indian hegdehog (IHH)*. Они отвечают за контроль лево-правой имметрии, детерминацию полярности в клетках центральной нервной системы, митов и конечностей, а также за формирование скелета.

SHH играет важнейшую роль в развитии центральной нервной трубки человеческого зародыша. Его «выключение» вследствие мутации, нарушающей полное разделение развивающегося мозга на два отдельных полушария и желудочки, приводит к серьезным, часто летальным последствиям, именующимся в клинике как голопрозэнцефалия (конечный мозг не разделен и представлен полусферой, обонятельные луковицы и тракты отсутствуют, гиппокамп резко гипоплазирован, цитоархитектоника коры неразделенного мозга нарушена).

DHH, по-видимому, контролирует вступление половых клеток в клеточное деление, его экспрессия отмечается в сертолиевых клетках яичек после активации гена *SRY*. У мышей-носителей мутации этого гена, наблюдалось снижение количества половых клеток и блок сперматогенеза, в результате чего развивалось бесплодие.

16.1.2. ГОМЕОЗИСНЫЕ ГЕНЫ

После установления границ каждого сегмента начинают формироваться их специфические черты, этот качественный процесс детерминируется гомеозисными генами, которых у дрозофилы насчитывается около полусотни. Их отличительным свойством является способность трансформировать один сегмент в другой. Предлагая термин **«гомеозис»** в 1894 г., Уильям Бэтсон подразумевал под ним превращение одной части тела в другую, а точнее гетеротопическую дупликацию – появление добавочного экземпляра какой-либо части тела в не характерном для нее месте. Гомеозисные гены дикого типа контролируют развитие определенных популяций клеток.

Мутации гомеозисных генов нарушают детерминацию, устанавливаемую у дрозофилы еще на стадии бластодермы. К их числу относятся: *Antennapedia* – развитие дополнительных ног на месте антенн; *ophthalmoptera* – развитие крыла из имагинального диска глаза; у мутантов *tumorous head* ткани головы замещаются другими типами тканей, включая структуры, характерные для гениталий, и т.д. Установлено, что у гомеозисных мутантов нарушен процесс детерминации имагинальных дисков, что и приводит в дальнейшем к ошибкам дифференцировки.

Последовательно расположенные области, содержащие кластеры гомеозисных генов локализованы у дрозофилы на небольшом участке третьей хромосомы (рис. 16.5). В одной из них находится комплекс *ANT-C*, включающий гены *Antennapedia (Antp)*, *Deformed (Dfd)* и *Sex comb reduced (Scr)*, которые контролируют развитие структур головы, первого и частично второго грудного сегмента. Во второй области локализован комплекс *BX-C*, включающий гены *bithorax (bx)*, *Contrabithorax (Cbx)*, *Ultrabithorax (Ubx)*, *bithoraxoid (bxd)*, *postbithorax (pbx)*, *abdominal A (abd A)* и *Abdominal B (Abd B)*, которые контролируют развитие остальных грудных и всех брюшных сегментов. Легко заметить в этом перечне гомеозисных генов колинеарность их расположения в комплексах *Antp* и *BX-C* контролируемым ими органам в направлении от структур головы к структурам заднебрюшных сегментов. В проявлении признаков у трансгетерозиготных дрозофил наблюдается определенная полярность. Так, особи *bxd* + / + *pbx* подвергаются в развитии превращениям по типу *pbx*, а не *bxd*; особи *bx* + / + *pbx* проявляют себя как *pbx*, а не *bx* и т.д.: нормальные аллели при расположении справа от мутантного локуса инактивируются таким образом, что экспрессиру-

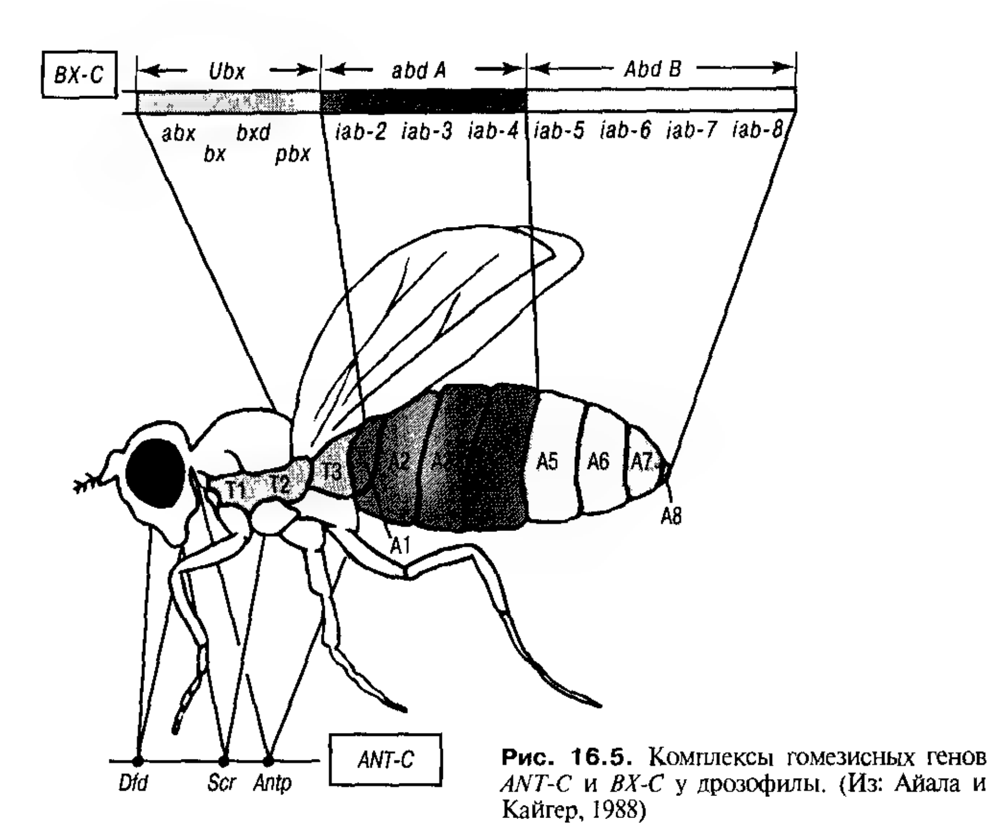


Рис. 16.5. Комплексы гомезисных генов *ANT-C* и *BX-C* у дрозофилы. (Из: Айала и Кайгер, 1988)

ется их рецессивный мутантный аллель. Объясняя эти особенности гомеозисных генов, американский генетик, Нобелевский лауреат Эдвард Льюис предложил гипотезу, базирующуюся на двух предположениях: серия мутантов *bithorax* подобна оперону бактерий; нормальные аллели гомеозисных генов продуцируют вещества, дающие морфогенетический эффект, а мутантные не способны синтезировать их. Из этой гипотезы вытекает ряд важных следствий. Во-первых, реализация плана сегментарного строения обеспечивается самой функциональной организацией локуса *BX-C*. Во-вторых, продукты каждого из генов, контролирующих сегментарное строение, должны выявляться в тканях соответствующих сегментов. В-третьих, координированное функционирование генов локуса *BX-C* возможно лишь при наличии специальных регуляторных участков. Наконец, принципы генетического контроля сегментации должны быть универсальными для всего животного мира.

Эти положения получили блестящее подтверждение в молекулярно-генетических работах. Все шесть гомеозисных генов удалось клонировать и с помощью гибридизации *in situ* установить характер их экспрессии. Было показано, что нормальная транскрипция у гомеозисных мутантов нарушена. Так, ген *Antp* дикого типа нормально экспресируется в торакальных сегментах, подавляя развитие в них головных структур. А у носителей доминантной мутации по гену *Antp* его транскрипты обнаружены не только в груди, но и в голове. В результате вместо антенных структур разви-

ваются членики ноги. Кроме того, было показано, что гомеозисные гены способны регулировать экспрессию других гомеозисных генов, причем экспрессия *Antp* и *Ubx* имеет комплементарный характер.

Изучение структуры любого биологического объекта, несомненно, приближает нас к пониманию его функций. Перечисленные ниже особенности структуры гомозиготных генов, установленные в результате их клонирования, свидетельствуют о чрезвычайной сложности регуляции развития.

1. Некоторые из гомеозисных генов имеют несколько промоторов и сайтов инициации транскрипции. Так два промотора имеет ген *Antp*, следствием чего является возможность транскрипции РНК двух типов.

2. РНК некоторых гомеозисных генов, в частности гена *Ubx*, подвергаются тканеспецифическому дифференциальному сплайсингу.

Таким образом, гомеозисные гены, контролирующие становление пространственной организации, по-видимому, работают не только по принципу «включен-выключен», но и с помощью сочетания набора их альтернативных состояний. Нормальная функция гомеозисных генов состоит в выборе или поддержании определенного пути развития, по которому следуют клетки. Каждый путь развития характеризуется экспрессией определенного набора генов, действие которых приводит к появлению конечного результата этого пути развития: глаза, крыла, ноги и т.д. В ходе мутационного анализа гомеозисных генов часто выявляется летальность для эмбриона тех мутаций (например, хромосомных делеций), которые полностью подавляют функцию гена.

Конкретные механизмы установления гомеозисными генами границ их экспрессии пока не выяснены. Однако один из них найден: все шесть гомеозисных генов имеют общую последовательность длиной 180 п.н., которой соответствует участок полипептидной цепи из 60 аминокислот. Эта область ДНК была названа **гомеобоксом** (*HOX* в англоязычной традиции), а ее белковый продукт – **гомеодоменом.** Термины были введены в 1984 г. В. Мактинисом, М. Скоттом и А. Вейнером. Гомеодомены разных гомеозисных генов гомологичны на 80–90%. Как было установлено впоследствии, гомеодомены принадлежат к числу факторов, активирующих транскрипцию.

16.1.3. ГОМЕОБОКСЫ У ЧЕЛОВЕКА И НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ

Гомологичные последовательности найдены в ДНК амфибий, мыши и человека. Продуктом их является белок, связывающийся с ДНК и выполняющий регуляторные функции (репрессия-дерепрессия ДНК). Тестирование геномов различных Metabiota радиоактивной ДНК гена *Antp* с помощью Саузерн-блоттинга позволило выявить у них гены с гомеобоксом. Такие гены удалось обнаружить у кольчатых червей, моллюсков, иглокожих, лягушек, мыши и человека. При этом удивительное сходство можно обнаружить, сравнивая гомеодомены гена *MM3* лягушки и гена *Antp* дрозофилы: 59 из 60 аминокислотных остатков одинаковы, несмотря на то, что мухи и лягушки развивались независимо 600 млн. лет.

У человека идентифицированы четыре *HOX*-кластера, каждый из который состоит из серии тесно сцепленных генов:

Кластер	Количество генов	Номера генов	Локализация
HOXA	11	1–7, 9–11, 13	7p
HOXB	10	1–9, 13	17q
HOXC	9	4–6, 8–13	12q
HOXD	9	1, 3, 4, 8–13	2q

Эти 39 генов удивительны тем, что большинство *HOX*-мутаций разрушительно, и при наличии их эмбрион нежизнеспособен. С другой стороны, высокая степень гомологии между *HOX*-генами разных кластеров может приводить к функциональной избыточности, за счет чего один *HOX*-ген может компенсировать утрату функции вследствие мутации другого *HOX*-гена. В этом контексте (внутривидовые гены, занимающие в разных кластерах одну и ту же позицию и характеризующиеся наибольшей гомологией) *HOX*-гены называют паралогами. Так ген 13 из *HOXD* имеет большее сходство с геном 13 из *HOXA* и геном 13 из *HOXC*, чем с другими членами кластера *HOXD*.

Мутация в гене 13 *HOXA* служит причиной аутосомно-доминантного синдрома, характеризующегося укорочением первого и пятого пальцев кистей и стоп в сочетании с гипоспадией или двурогой маткой в зависимости от пола ребенка.

Мутация в гене 13 *HOXD* проявляется как синполидактилия – аномалия развития конечностей, наследующаяся по аутосомно-доминантному типу и характеризующаяся появлением дополнительного пальца между третьим и четвертым, фаланги которых частично срослись.

Что касается рассмотренных нами у дрозофилы генов группы *pair-rule*, то у млекопитающих обнаружен ее аналог, получивший название *PAIR-BOX (PAX)*. Девять *PAX*-генов были идентифицированы у мыши и человека. У мыши они играют важную роль в развитии нервной системы. У человека мутации утраты функции четырьмя *PAX*-генами могут быть идентифицированы в связи с определенными аномалиями развития:

1) мутация в *PAX3* (локализация гена – 2q35) обусловливает синдром *Ваарденбурга* 1-го типа, наследуемый аутосомно-доминантно и характеризующийся нейросенсорной глухотой, участками депигментации волос (часто в виде белой пряди) и аномальным паттерном пигментации радужек – гетерохромией;

2) мутация в *PAX2* (локализация гена – 10q24) обусловливает синдром, при котором отсутствие почек и мочеполовых протоков (при наличии гонад и надпочечников) сочетаются со структурными дефектами в разных отделах глаза, включая сетчатку и зрительный нерв;

3) мутация в *PAX6* (локализация гена – 11p13) приводит к развитию аниридии, которая в свою очередь является ключевым признаком для WAGR-синдрома. Этиологическая причина этого синдрома – делеция генных последовательностей, включающих локус *PAX6* на коротком плече хромосомы 11;

4) наконец, значение экспрессии генов семейства *PAX* у человека демонстрирует также эффект мутации в *PAX8* (локализация гена – 2q12), реализующийся в клинике как отсутствие или эктопия щитовидной железы.

Известны несколько других генов также образующих домен, подобный гомеобоксу. Это гены *MSX2* и *EMX2*. Мутация в гене *MSX2* приводит к краниосиностозу, т.е. преждевременному зарастанию швов черепа, что ограничивает его рост и приводит к деформации. Этот наиболее частый порок развития черепа поддается хирургическому лечению в возрасте до 3-х месяцев. Мутация в гене *EMX2* является причиной шизэнцефалии – расщелины мозга в одном или обоих полушариях. К генам развития относится и семейство так называемых генов «цинковых пальцев», продуцирующих ДНК-связывающие белки. Как уже указывалось в гл. 12, они играют роль регуляторов транскрипции и содержат характерный домен, который включает два цистеиновых и один гистидиновый остаток. Эти аминокислоты взаимодействуют с ионом цинка, а расположенная между ними полипептидная цепочка выпетливается в виде «пальца». Гены «цинковых пальцев», также являются ответственными за некоторые болезни развития.

Например, протяженные делеции или транслокации, захватывающие ген *GLI3*, приводят к формированию синдрома *цефалополисиндактилии Грейга*, для которого характерны множественные аномалии головы, кистей и стоп. По контрасту мутации со сдвигом рамки считывания в том же гене приводят к формированию синдрома *Паллистера–Холла,* клинически проявляющегося в совокупности гипоталамической гамартомы, неперфорированного ануса и присущей предыдущему синдрому полидактилии.

Мутации генов *ZIC2* и *ZIC3* соответственно приводят к голопрозэнцефалии и латеральным дефектам, заключающимся в аномалиях развития и позиционирования непарных органов: сердца, печени и селезенки.

Мутации в области еще одного «цинкового пальца», содержащего ген *WT1* (*Wilm's tumor-associated gene* – состоит из 10 экзонов и кодирует 16 основных изоформ белка) хромосомы 11, могут быть причиной двух состояний:

1) у гетерозигот по делециям гена развивается *WAGR-синдром* (имеющий в своем составе опухоль Вилмса, аниридию, задержку умственного развития и дисгенезию гонад с предрасположенностью к возникновению гонадобластом);

б) у гетерозигот по миссенс-мутациям гена формируется *синдром Дениса–Драша*, характеризующийся наличием у пациента опухоли Вилмса, тяжелой прогрессирующей нефропатии с потерей белка и неопределенных наружных гениталий.

Таким образом функционируют эти несколько семейств генов развития: семейство генов сегментации, кластеры гомеобоксных генов, *Pair-box* гены, семейство генов «цинковых пальцев». Кроме них известны еще три семейства:

1. Серия генов *SOX*. Они являются гомологами локализованного на Y-хромосоме гена SRY, роль которого в первичной детерминации пола уже описана в гл. 8.

Экспрессия гена *SOX9* (*SRY-related HMG box-containing gene*) кроме полового валика, обнаружена также в хондроцитах развивающейся костной ткани человека, в связи с чем мутации гена *SOX9* вызывают кампомелическую дисплазию, характеризующуюся множественными аномалиями скелета и внутренних органов. Гомолог человеческого гена – *Sox-9* у мыши также необходим для нормального развития скелета. Всего же семейство *Sox* у мыши состоит более, чем из двух десятков генов, характеризующихся тканеспецифической экспрессией в раннем эмбриогенезе: например, *Sox 1-3* в нервной системе, *Sox-4* – в иммунной. Имеющиеся данные позволяют утверждать, что у позвоночных гены с гомеобоксом выполняют морфогенетические функции.

2. Серия генов *T-box*, экспрессия которых имеет важное значение для формирования мезодермы. В геноме человека они распределены дисперсно в виде небольших кластеров.

3. Гены сигнальной трансдукции (процесса, при котором внеклеточные факторы роста регулируют клеточное деление и дифференцировку, используя комплексные пути генетически детерминированых промежуточных шагов). Мутации большинства этих генов играют важную роль в канцерогенезе. В некоторых случаях они могут также быть причиной аномалий развития.

В результате изучения гомеозисных генов у позвоночных было установлено сохранение описанного выше для дрозофилы принципа колинеарности, т.е. активность *HOX*-генов млекопитающих вдоль передне-задней оси тела отражает последовательность этих генов в кластере. Для выяснения роли конкретных *HOX*-генов в эмбриогенезе млекопитающих особенно информативным оказался *метод нокаута* (*knockout*), состоящий в замещении нормального аллеля мутантным. Этот же метод оказался чрезвычайно эффективным при изучении генетических основ эмбриональной индукции, которые будут рассмотрены ниже.

16.2. ГЕНЫ, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ ЭМБРИОНАЛЬНУЮ ИНДУКЦИЮ

16.2.1. ИНДУКЦИЯ И ОРГАНОГЕНЕЗ

Органогенез включает в себя многие клеточные процессы, такие как клеточная пролиферация, адгезия клеток, апоптоз, дифференцировка клеток, изменение формы клеток и клеточная миграция. В последние годы при изучении потомков мутантных мышей были обнаружены многие существенные для контроля развития гены, которые управляют совокупностью формообразовательных процессов ряда органов, в частности и такого, как почка. В изученни механизмов морфогенеза почка – один из главных выделительных и гомеостатических органов, является удачной моделью (отчасти благодаря простоте, с которой она может изучаться в культуре). Как и в случае других органов, развитие почки регулируется последовательными и реципрокными индуктивно-тканевыми взаимодействиями.

Первооткрыватель эмбриональной индукции Ганс Шпеман еще в 20-е годы прошлого века наблюдал взаимодействие эмбриональных закладок, приведшее к формообразовательному эффекту: в результате пересадки кусочка индуцирующей ткани от одного зародыша тритона на брюшную часть другого зародыша образовалась дублирующая система осевых органов. Практически через 30 лет после этого Клиффорд Гробстайн, культивируя зачаток мочеточника и почечную мезенхиму, продемонстрировал реципрокную индукцию вне организма: зачаток мочеточника рос и ветвился только в присутствие мезенхимы и, наоборот, в мезенхиме формировались почеч-

ные канальцы только при культивировании ее вместе с зачатком мочеточника. Таким образом, оба зачатка выступали друг по отношению к другу либо в роли индуктора, либо как реагирующая на его воздействие компетентная ткань. Этот вариант первичной эмбриональной индукции в дальнейшем был классифицирован как *мезодермально-энтодермальный*, или *эпителио-мезенхимный*. Он характерен для развития органов, формирующих протоки. Кроме него, различают *архенцефалическую* эмбриональную индукцию, в результате которой формируется передний мозг, нос и глаза, а также - *дейтеренцефалическую*, запускающую формообразование среднего и заднего мозга, а также слуховых пузырьков.

Если индукция структуры произошла, то она вступает в дифференцировку, с которой теснейшим образом связан морфогенез. В нормальных условиях эта связь выражается в четкой скоординированности индукции и дифференцировки.

16.2.2. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ МОРФОГЕНЕЗА ПОЗВОНОЧНЫХ НА ПРИМЕРЕ ПОЧКИ

Кратко морфогенез почек можно описать следующим образом. Почка взрослого млекопитающего, так называемый метанефрос (вторичная почка), развивается из вольфова протока и мезенхимы метанефроса, которые оба происходят от промежуточной мезодермы (рис. 16.6, *а*). Метанефрическая почка начинает развиваться после того, как вольфов проток продлевается каудально вдоль оси тела и продуцирует вырост – зачаток мочеточника (на 10,5–11 день у мыши и 35–37 день у человека). После внедрения в ткань мезенхимы, этот зачаток стимулирует окружающие его клетки, приводя к их уплотнению в форме шляпки в нефрогенной мезенхиме (рис. 16.6, *б*). На периферии этой мезенхимы, а также между ветвями мочеточника развивается строма. Затем уплотненные клетки мезенхимы стимулируют зачаток мочеточника к ветвлению и формированию двух новых концов (рис. 16.6, *в*), а сами начинают формировать претубулярные агрегаты, которые подвергаются эпителио-мезенхимному переходу и дают начало эпителиальным почечным трубочкам, развивающимся в нефроны – выделительные единицы почки (рис. 16.6, *г*).

В процессе разветвления эпителиального зачатка мочеточника, каждый конец действует как индуктивный центр, инициирующий нефрогенез, образуя новые эпителиальные концы после того, как ветвь удлинилась и обособилась. Индукция эпителиальных трубочек многократно повторяется, чтобы произвести 12 000 нефронов в почке мыши и 500 000–1 000 000 нефронов в человеческой почке. Ветви зачатка мочеточника, в конечном счете, формируют систему протоков, которая собирает мочу в почечную лоханку и мочевой пузырь. У человека нефрогенез к моменту рождения завершается, а у крыс и мышей продолжается постнатально.

Инициирует ли мезенхима метанефроса органогенез, стимулируя формирование зачатка мочеточника, который затем внедряется в нее и начинает ветвиться? Или же инициирующие сигналы исходят от вольфова протока до отпочковывания зачатка мочеточника?

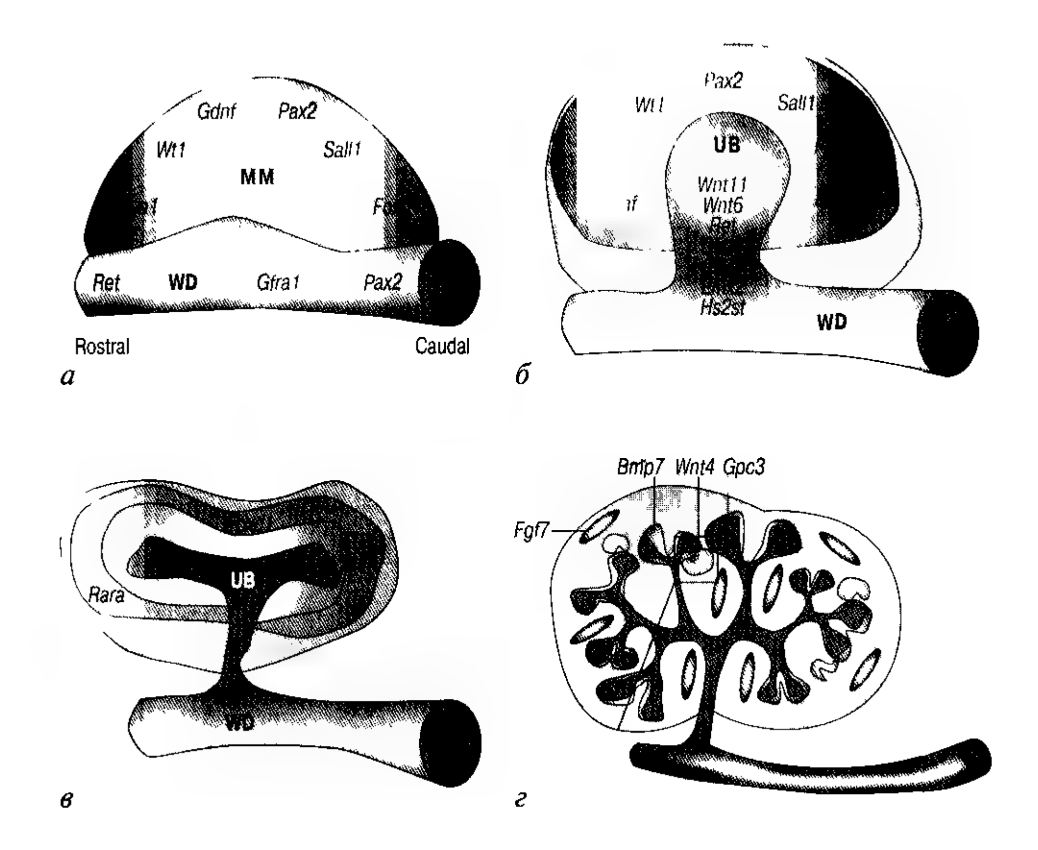


Рис. 16.6. Морфологические стадии раннего развития почки у мыши и некоторые включенные в него гены. (*Из: Vainio & Lin, 2002*)

Обозначения: WD – вольфов проток; MM – мезенхима метанефроса; UB - зачаток мочеточника. Bmp7, Emx2, Eya1, Fgf7, Foxc1, Foxd1, Gdnf1, Gfra1, Gpc3, Hs2st, Pax1, Rara, Ret, Sall1, Wnt, Wt1 – гены, вовлеченные в ранние стадии морфогенеза почки у мыши.

Установлено, что мышиный ген *Wt1* (гомолог гена *WT1* у человека) кодирует фактор транскрипции, представленный несколькими изоформами, играющими различные роли в формировании мочеполовой системы. Как уже упоминалось выше, мутация гена *WT1* у человека может привести к возникновению опухолей почек в детстве или развитию определенных наследственных заболеваний с аномалиями гонад и почек: *синдром Дэниса Драша*, *синдром Фразье* и *синдром WAGR*. Экспрессия *Wt1* сначала проявляется в уплотнении мезенхимных клеток. У мышей с выключенным (нокаутированным) *Wt1*-геном мезенхима метанефроса формируется, но зачаток мочеточника не в состоянии развиваться из вольфова протока, что в итоге приводит к полному отсутствию почки. Как фактор транскрипции Wt1 может регулировать экспрессию секретируемых факторов, являющихся медиаторами мезенхимных сигналов, которые индуцируют формирование зачатка мочеточника. Wt1 может так-

же регулировать способность мезенхимы метанефроса отвечать на индуктивные сигналы, получаемые от зачатка мочеточника.

Как прямая мишень для Wt1 при инициировании почечного развития, был идентифицирован амфирегулин, принадлежащий к семейству эпидермальных факторов роста (Egf). Однако блокирование активности амфирегулина в культуре органа не предотвращает раннее развитие зачатка мочеточника. Вследствие этого механизм действия Wt1 при инициировании развития почки еще предстоит выяснить. Установлено, что гомеобоксный ген *Pax2* (аналог *PAX2* человека) также регулируется Wt1, поскольку его экспрессия подавляется Wt1 in vitro и, кроме того, снижена в почечной мезенхиме *Wt1*-мутантных эмбрионов.

В свою очередь Pax2 также может управлять инициированием морфогенеза почек, влияя на экспрессию нейротрофического фактора *Gdnf*, вырабатываемого линией глиальных клеток. *Gdnf* кодирует фрагменты семейства преобразующих факторов роста (Tgf-β) – сигнальных молекул, которые играют важную роль в индукции зачатка мочеточника. Отсутствие *Pax2* вызывает утрату экспрессии *Gdnf* в метанефрической мезенхиме.

Показано, что локальное действие Gdnf на одну из сторон вольфова протока in vitro индуцирует образование добавочных зачатков мочеточника. Это может служить доказательством достаточности Gdnf для индукции формирования зачатка мочеточника, а позже – для регуляции его ветвления. Вероятно, вместе с Gdnf в регуляцию формирования данного зачатка вовлечены и другие факторы, так как экспрессия *Gdnf* сохраняется, например, в лишенных *Wt1* почках, где отсутствует обособление зачатка мочеточника. Кроме того, Gdnf не стимулирует ветвление изолированного зачатка, культивируемого in vitro.

Предполагают, что экспрессия *Gdnf* в почечной мезенхиме регулируется геном *Eya1* – гомологом гена отсутствия глаз у дрозофилы (*Eya*), который кодирует другой фактор транскрипции гомеобоксного семейства генов. *EYA1*-мутации у человека лежат в основе *бранхио-ото-ренального (BOR) синдрома*. Как и в случаях с *Wt1*, *Pax2* и *Gdnf*-мутантами, зачаток мочеточника будет не в состоянии внедриться в почечную мезенхиму эмбриона мыши при отсутствии *Eya1*. В отсутствие *Eya1* также нет экспрессии *Gdnf*, но *Pax2* продолжает экспрессироваться в мезенхиме этих мутантных эмбрионов. Это позволяет утверждать, что, регулируя инициирование развития почки, *Eya1* функционирует в мезенхимной сигнализации ранее *Gdnf*, но позже *Pax2*.

Недавно было открыто воздействие на раннее развитие почки гена *Sall1* – свойственного млекопитающим гомолога регион-специфического гомеозисного гена дрозофилы *spalt* (*Sal1*). *SALL1*-мутации у человека ведут к развитию *синдрома Таунс–Брокса* – аутосомно-доминантного заболевания, которое характеризуется дисплазией ушных раковин, преаксиальной полидактилией, заращением ануса, а также аномалиями почек и сердца. *Sall1* экспрессируется в почечной мезенхиме, и его инактивация у мышей ведет к недоразвитию мочеточника и отсутствию в нем протока. Установлено, что мезенхима у эмбрионов мышей с отсутствием данного гена (*Sall1-null*) может формировать протоки при индукции со стороны спинного мозга in vitro, т.е. дефект у особей с «отключенным» *Sall1* наблюдается в зачатке мочеточника. Экспрессия *Gdnf*, *Eya1* и *Wt1* продолжается в мезенхиме *Sall1*-мутантов, указывая, что *Sall1* находится «ниже» этих сигналов или возможно действует независимо от них.

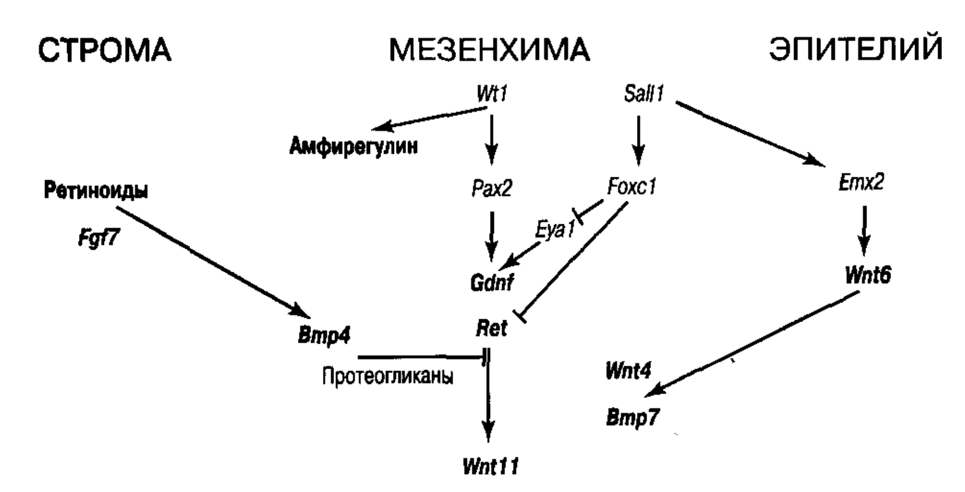


Рис. 16.7. Модель взаимодействия генов в ходе раннего развития почки у мыши. (Из: Vainio & Lin, 2002)

Гипотетические взаимодействия основаны на результатах экспрессии in vivo у knockout-мутантов мыши, только в нескольких случаях подтвержденных биохимически. Светлым шрифтом обозначены факторы транскрипции; жирным шрифтом – факторы роста или их рецепторы.

Местоположение формирования зачатка мочеточника на вольфовом канале, возможно, определяется экспрессирующимся в почечной мезенхиме фактором транскрипции, принадлежащим к семейству *Foxc1* (*forkhead box C1*). Данное предположение подтверждается тем, что у *Foxc1*-нокаутированных эмбрионов формируются двойные зачатки мочеточника и почки. По-видимому, *Foxc1* выполняет свою функцию, подавляя *Gdnf* и *Eya1* в передней части почечной мезенхимы.

Сводка имеющихся данных о раннем развитии почки, представленная на рис. 16.7, свидетельствует, что в инициировании ее морфогенеза участвует множество генов, которые не могли бы функционировать независимо друг от друга. Экспрессия многих из этих рано действующих генов в мезенхиме указывает, что данная ткань может специализироваться первой и что сигнал из мезенхимы может стимулировать формирование зачатка мочеточника. Интересно, что большинство факторов, инициирующих развитие почки, – это факторы транскрипции, которые экспрессируются в мезенхиме метанефроса. Их гены также могут играть роль в ее обособлении от остальной части почечной мезенхимы. Для доказательства необходим детальный анализ экспрессии у особей дикого типа и «нокаутированных» мутантов, а также – у гибридных особей со смешанными признаками.

В зачатке мочеточника экспрессируется тирозинкиназный рецептор Ret (при мутации он может проявлять себя как онкогенный). Показано, что, Gdnf и Ret - взаимно стимулирующие белки, *Gdnf*-индукция развития зачатка мочеточника является Ret-зависимой, а отсутствие и *Ret*, и *Gdnf* имеет сходное фенотипическое проявление. Следовательно, локальная мезенхимная экспрессия *Gdnf* вносит вклад в индукцию зачатка мочеточника посредством передачи сигналов Ret, который контролирует пролиферацию и ветвление его зачатка.

Ген, кодирующий корецептор для Ret — *Gfra1* (производный глиальной линии клеток нейротрофический рецептор фактора-α1), также экспрессируется в зачатке мочеточника, и его инактивация у мышей ведет к появлению фенотипа, подобного наблюдаемому у мышей с «угнетенными» генами *Ret* и *Gdnf*, что подтверждает роль *Gfra1* в передаче сигналов Gdnf. Недавние исследования показали, что две изоформы Ret (Ret9 и Ret51) имеют различное действие *in vivo*: моноизоформные *Ret51* мыши, у которых нет *Ret9*, характеризуются гиподисплазией почки и недостаточностью кишечных ганглиев в толстом кишечнике.

Возможно, Ret/Gfra1/Gdnf-система координирует рост мочеточника с помощью других секретируемых факторов, к которым относится, в частности, белок Bmp4, стимулирующий морфогенез костной ткани. Ген *Bmp4* экспрессируется в клетках мезенхимы, которые окружают вольфов проток и ствол мочеточника в месте, удобном для регуляции роста данного зачатка. Эмбрионы мыши с генотипом $Bmp^{4+/-}$ имеют целый ряд аномалий развития, включая дефекты почек, вызванные нарушением регуляции развития зачатка мочеточника, причем эти аномалии подобны врожденным порокам развития почки и мочевого тракта у человека. В клеточной культуре Bmp4 регулирует гены, которые экспрессируются и в мочеточниковом зачатке, и в мезенхиме, включая *Gdnf*.

Белки поверхности клетки, такие как протеогликаны (PGs), также вовлечены в регуляцию роста и разветвления мочеточника в процессе развития почки. PGs клеточной поверхности принимают участие в передаче сигналов фактора роста фибробластов (Fgfs) и входят в семейство факторов Wnt. При удалении или изменении в почке цепей PGs in vitro с помощью химических реагентов, модифицирующих синтез, зачаток мочеточника приостанавливает свой рост и ветвление. Эти преобразования могут также вызывать полную реверсию действия Bmp4: от подавления роста зачатка мочеточника к стимулированию его ветвления, что указывает, на возможность для PGs контролировать специфический тип ответа на факторы роста. Вопрос об участии специфических PGs в развитии почки вышел на первый план после экспериментов по выключению (нокаутированию) у мышей гена одного из протеогликанов (*Gpc3*), который также видоизменен у людей с синдромом *Симпсона–Голаби–Бемеля* и почечной дисплазией.

Системе сигнализации Gdnf/Ret принадлежит решающая роль в индукции мочеточников и их ветвлении, но она может модулироваться другими факторами, способствуя генерации специфического паттерна в древе ветвления мочеточников. Начиная с пионерских работ К. Гробстайна, установлено, что почечные канальцы индуцированы тканевыми взаимодействиями. Формирование трубки в мезенхиме вызвается *in vivo* зачатком мочеточника, а in vitro – различными индукторами, например, спинным мозгом. Классическое представление об индукторах состояло в том, что мезенхимные клетки, которые входят в контакт с зачатком мочеточника и его сигналом, продолжают формирование почечных канальцев. За последние годы, однако, и в эпителии мочеточников, и в мезенхиме были идентифицированы гены, необходимые для нефрогенеза, играющие решающую роль и для сигналов, генерируемых зачатком мочеточника, и для сигналов – производных мезенхимы. Эти гены также определяют нисходящие сигналы в почечной мезенхиме, управляющие нефрогенезом.

В экспериментах по инактивация гена *Emx2* у мышей был получен материал для модели, в которой сигнал зачатка мочеточника участвует в индукции канальца *in*

vivo. Как гомеобокс-содержащий фактор транскрипции, который экспрессируется первоначально в зачатке мочеточника, *Emx2* может также регулировать экспрессию других генов, вносящих вклад в нарушение тубулогенеза при отсутствии *Emx2*. У *Emx2*-нокаутных мышей, зачаток мочеточника внедряется в мезенхиму метанефроса, *однако индукция канальцев* отсутствует и, следовательно, развития почки не происходит. Причиной является то, что, хотя некоторые мезенхимные и эпителиальные маркерные гены раннего почечного развития, такие как *Wt1*, *Gdnf* и *Ret*, экспрессированы у *Emx2*-мутантов, в клетках их мезенхимы отсутствует экспрессия *Wnt4* – важного первоначального сигнала для тубулогенеза.

Wnt - большое семейство секретируемых сигналов, которые регулируют ключевые морфогенетические шаги в ходе эмбриогенеза. В 1994 г. было установлено, что Wnt1 может дублировать влияние спинного мозга (в пробах почечной культуры органа), играя роль индуктора тубулогенеза. С тех пор Wnts отнесены к тубуло-индуктивным сигналам. Однако в норме *Wnt1* не экспрессируется в эмбриональной почке. Данный факт указывает, что он дублирует сигнализацию другого члена этого семейства, который экспрессируется в почечной мезенхиме или зачатке мочеточника. Действительно, в уплотненной мезенхиме и претубулярных агрегатах экспрессируется *Wnt4*, который, вероятно, и является тем *мезенхимным сигналом, который участвует* в эпителио-мезенхимном переходе. Интересно, что клетки, экспрессирующие ряд *Wnt*, были в состоянии стимулировать тубулогенез в почечной мезенхиме in vitro. Клетки, экспрессирующие *Wnt4*, могли также преодолеть дефект тубулогенеза в мезенхиме *Wnt4*-мутантов. Эти исследования указывают на важность тубуло-стимулирующей роли Wnt4 и свидетельствуют, что классическая, стимулирующая почку, фильтрующая проба, при которой почечный тубулогенез вызван совместным культивированием эмбриональной почки и части спинного мозга, может действовать благодаря тому, что спинной мозг производит сигнал Wnt. Другой *Wnt* – *Wnt6*, экспрессируется в развивающейся почке, на концах зачатка мочеточника, что делает его возможным индуктором восходящей *Wnt4*-регуляции.

Важными регуляторами развития являются и ростовые факторы Bmp, принадлежащие Tgf-β-суперсемейству выделяемых сигналов. Хотя некоторые Bmp экспрессируются в почке, первое генетическое доказательство того, что они функционируют в течение нефрогенеза, было получено путем нокаутирования *Bmp7* у мышей. Почки у них сначала формируются как обычно, происходит и ветвление зачатка мочеточника, но, начиная с 14.5 дня развития, нефрогенез прекращается. Экспрессия *Pax2*, *Wt1* и *Wnt4* снижена в мезенхиме метанефроса у мутантов, и это может объяснять усиленный апоптоз, который замечен в почках *Bmp7*-нокаутных эмбрионов. Таким образом, Bmp7 может функционировать в качестве сигнала выживания, который предотвращает подверженность мезенхимных клеток апоптозу.

Показано, что дополнительный Bmp7 в культуре предотвращает подверженность апоптозу клеток дикого типа в мезенхиме метанефроса, но такие мезенхимные клетки не способны формировать канальцы. В соединении с Fgf2, однако, Bmp7 может стимулировать рост клеток стромы и поддерживать способность мезенхимы метанефроса мезенхимы подвергаться нефрогенезу in vitro. На основе этих результатов было высказано предположение, что нефрогенная мезенхима служит источником сигналов, которые способствуют быстрому увеличению стромальных клеток-пред-

шественников. Эти клетки в свою очередь, выделяют еще не идентифицированные анти-дифференциационные сигналы и сигналы выживания, контролирующие интенсивность нефрогенеза.

В настоящее время известно, что и эпителиальные, и мезенхимные гены регулируют индуктивные взаимодействия в почке, сигнализация Wnt идентифицирована как критический индуктор тубулогенеза. Вероятно, что активность Wnt модулируется другими проводящими путями, такими как Notch и Bmp, что остается предметом дальнейшего изучения.

В дополнение к зачатку мочеточника и нефрогенным центрам сигнализации мезенхимы важным источником сигнализации в почечном органогенезе является строма. Первое свидетельство значения стромы было получено при изучении экспрессирующегося в ней нокаутированного *Foxd1*-гена. Хотя его инактивация ведет к дефектам в системе собирающего протока и нефронов, он не экспрессируется в клетках названных тканей. Это позволило предположить, что Foxd1 может участвовать в почечном развитии, регулируя экспрессию сигналов, продуцируемых клетками стромы. Данные сигналы способствуют тубулогенезу и развитию зачатка мочеточника. Сигнализация клеток стромы поддерживает экспрессию гена *Ret*, которая, в свою очередь, подключает сигнализацию, регулирующую дифференцировку мезенхимных клеток. Эти данные указывают, что между стромой, зачатком мочеточника и почечной мезенхимой может существовать сигнальное кольцо, которое коорди-

Таблица 16.1. **Гены, важные для раннего развития почки мыши (По: Vainio & Lin, 2002)**

Ген (генотип)	Место экспрессии	Фенотипические проявления
		ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ
Emx2	UB, MM	Полное отсутствие почек, мочеточников и полового тракта
Eya11	MM	Отсутствие роста мочеточников, проблемы индукции MM
Foxc1	MM	Две почки и четыре мочеточника
Foxd	S	Почки маленькие, кол-во нефронов уменьшено
Pax2	UB, MM	Замедленный рост мочеточников, нет индукции ЬЬ
Rara, Rarb	UB, S, MM	Гипоплазия/агенезия
Sall1	MM	Мезенхима метанефроса подвергается апоптозу
		ФАКТОРЫ РОСТА
Bmp4	Mm	Гипо-/дисплазия почек, удвоение собирающего протока
Bmp7	UB, MM	Резкая гипоплазия почек, уменьшение кол-ва нефронов
Egf7	S	Почки маленькие, уменьшение ветвления мочеточников
Gdnf	MM	Агенезия почек из-за отсутствия развития мочеточника
Wnt4	MM	Проблемы формирования почечных канальцев
		ФАКТОРЫ РОСТА/РЕЦЕПТОРЫ
Gfra1	UB, MM	Агенезия почек
Notch2	MM	Дефект гломерул в развивающихся нефронах
Ret	UB	Проблемы с ростом мочеточников
		ПРОТЕОГЛИКАНЫ и их ФЕРМЕНТЫ
Hs2s	UB, MM	Агенезия почек из-за отсутствия уплотнения мезенхимы
Gpc3	UB, MM	Селективная дегенерация собирающих протоков медуллярного слоя почки

Обозначения. MM – мезенхима метанефроса, UB – зачаток мочеточника, S – строма.

нирует почечное развитие. Стромальная сигнализация может также влиять на нефрогенную мезенхиму или на зачаток мочеточника, а сигнализация от нефрогенной зоны может, в свою очередь, регулировать компартмент стромы. Анализ мутантных фенотипов дает обширную информацию о природе клеток и взаимодействии тканей, которые управляют ранним развитием почки (табл. 16.1).

Что касается молекулярной природы индукторов у других модельных организмов, то гомологи трех из числа названных в таблице генов играют важную роль в индукции образования мезодермы уже упоминавшейся африканской шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. Это гены семейств *BMP*, *FGF* и *Wnt*. Так, в результате экспрессии гена *BMP4* индуцируется дорсо-вентральная организация мезодермы, ген *FGF* вовлечен в индукцию вентро-латеральной мезодермы, а гены семейства *wnt Xenopus* (*Xwnt-1* и *Xwnt-8*) играют существенную роль в индукции формирования полной дорсальной оси зародыша *Xenopus*. Экспрессия Frizzled-связанного белка (sFrp), который противодействует эффектам индукции *Xwnt8* у лягушек и, очевидно, предотвращает активацию рецептора, также коррелирует с экспрессией *Wnt4* в почке мыши.

Кроме того, два гомолога относятся к нейроиндуцирующим факторам. Это – ген *Xotch* у шпорцевой лягушки, продукт которого локализуется в дорсальной эктодерме нейрулы. У дрозофилы его гомолог – ген *Notch*, участвует в выборе клетками нейроэктодермы нейрального или эпидермального пути развития. Другой ген *Wnt-1* экспрессируется в области среднего и заднего мозга и участвует в индукции клеточной пролиферации.

Изучение почки позволило уточнить механизмы специализации эпителиальных клеток и взаимных индуктивных взаимодействий, которые существуют между различными типами клеток и тканей, а также вклад, который эти взаимодействия вносят на ранних этапах развития. Некоторые «почечные» мутанты мышей, оказались также полезными моделями для изучения наследственных болезней почек и расстройств у человека.

глава

ПОПУЛЯЦИОННАЯ ГЕНЕТИКА

Популяционная генетика изучает генетическое разнообразие в популяциях и закономерности изменения этого разнообразия в чреде поколений (во времени) и в разных частях ареала (в пространстве). К этой области науки относят как исследования природных и экспериментальных популяций, так и теоретические. Цель популяционной генетики – описать генетическую структуру популяции и факторы, которые определяют изменения этой структуры.

Развитие теоретической и экспериментальной генетики популяций послужило основой для синтеза генетики и дарвинизма и создания современной теории эволюции. Основополагающее значение имела вышедшая в 1926 г. работа С. С.Четверикова «О некоторых моментах эволюционного процесса с точки зрения современной генетики». В этой работе обоснованы представления о мутационном процессе и судьбе мутаций в природных популяциях, о роли отбора и изоляции в эволюционном процессе. В условиях свободного скрещивания, по С.С. Четверикову, вид «как губка впитывает в себя гетерозиготные геновариации (мутации), сам оставаясь при этом все время внешне однородным». В конце 20-х –начале 30-х годов ученики С.С. Четверикова – Н.В. Тимофеев-Ресовский, Б.Л. Астауров, Е.И. Балкашина, Д.Д. Ромашов, С.М. Гершензон и др. – предприняли попытку анализа генетической структуры природных популяций дрозофил и обнаружили в них высокую концентрацию рецессивных мутаций. Большой вклад в изучение природных популяций и развитие теоретической популяционной генетики внесли исследования отечественных ученых А.С. Серебровского, Н.П. Дубинина, С.М. Гершензона, П.Ф. Рокицкого, Н.К. Беляева, Ф. Добжанского. В это же время теоретическая популяционная генетика начинает бурно развиваться и на Западе. Оосновоположниками этой школы можно считать Р. Фишера и С. Райта, Дж. Холдейна.

17.1. ПОНЯТИЕ О ПОПУЛЯЦИИ. ЧАСТОТЫ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЕЙ В ПОПУЛЯЦИИ

По определению Н.В. Тимофеева-Ресовского, популяция – это группа особей определенного вида, которая: 1) в течение достаточно длительного времени (большого числа поколений) населяет конкретный ареал; 2) в той или иной степени случайно скрещивается в его пределах; 3) не имеет внутри себя заметных изоляционных барь-

сров; отделена от соседних групп этого вида той или иной степенью давления тех или иных форм изоляции. Данное определение указывает на те характеристики группы индивидов, изучение которых необходимо для определения границ популяции. При анализе популяций человека необходим учет этнических характеристик населения, естественноисторических и социально-исторических данных.

Исследования природных популяций растений, животных и человека показали, что особи, составляющие популяцию, отличаются друг от друга по большому числу признаков. Большая доля этого разнообразия обусловлена генотипическим разнообразием. Самый простой способ описать генотипическое разнообразие в популяции – это определить частоты особей разных генотипов. Однако это практически невозможно, так как в подавляющем большинстве случаев мы не в состоянии однозначно по фенотипу сделать заключение о генотипе особи. Важной характеристикой генетической структуры популяции служат частоты аллелей. Этот показатель можно вычислить, зная частоты генотипов. В табл. 17.1 приведены частоты лиц с группами крови M, N и MN в нескольких популяциях русских. Различия по группам крови контролируются двумя аллелями одного гена, по которым имеет место кодоминирование, поэтому каждому фенотипу (группе крови) соответствует определенный и единственный генотип. Лица с группой крови M имеют генотип L^ML^M, с группой крови N имеют генотип L^NL^N и с группой крови MN генотип L^ML^N. В каждой популяции встречаются лица, имеющие разные фенотипы и генотипы.

Вычислим частоту аллеля L^M в популяции Ленинграда. Так как гомозиготы L^ML^M имеют по два аллеля L^M, а гетерозиготы – по одному аллелю L^M, частота аллеля L^M в популяции равна сумме частоты гомозигот и половине частоты гетерозигот:

частота $L^M = 32{,}1 + 1/2\ 46{,}6 = 55{,}4\%$;

частота аллеля L^N, естественно, равна $100 - 55{,}4 - 44{,}6\%$;

Частоты аллелей L^M и L^N в популяции деревни Лобан равны, соответственно, 36,8% и 63,2%. Таким образом, популяции различаются по частотам лиц с разными генотипами и по частотам аллелей.

Чтобы в общем виде записать зависимость частоты аллеля от частот генотипов введем обозначения:

p – частота аллеля A

q – частота аллеля a, естественно, $p + q = 1$

D – частота доминантных гомозигот AA

H – частота гетерозигот Aa

R – частота рецессивных гомозигот aa, естественно, $D + H + R = 1$.

Таблица 17.1. **Частоты генотипов (%) в популяциях русских (Из: Рычков, 2000)**

Популяция	Группа крови			Число обследованных
	M	MN	N	
Ленинград	21,1	46,6	21,3	701
Москва	35,7	48,2	16,1	10399
Архангельская обл., д. Лобан	10,5	52,6	36,8	76
Казахстан, с. Малоубинка	46,7	31,4	21,9	137

Тогда частоты аллелей будут равны:

$p = D + 1/2H$, так как каждый гомозиготный индивидуум *АА* имеет только аллели А, и только половина аллелей каждой гетерозиготы это *А*. Точно также

$q = R + 1/2H$.

Зная частоты всех генотипов в популяции, по этим формулам можно вычислить значения частот аллелей. По частотам аллелей нельзя найти единственного соотношения генотипов в популяции. Так, частотам $p = q = 0,5$ могут соответствовать популяции с различными частотами генотипов. Это может быть популяция, состоящая, например, из 100% гетерозигот *Аа*; или – из *50% АА* и *50% аа*; или из *25% АА*, *50% Аа* и *25% аа* и др.

В случае нескольких аллелей частота каждого аллеля равна сумме частоты гомозигот по этому аллелю и половине суммы всех гетерозигот, имеющих этот аллель.

17.2. ЗАКОН ХАРДИ–ВАЙНБЕРГА И УСЛОВИЯ ЕГО ВЫПОЛНЕНИЯ

В 1908 г. независимо друг от друга Г. Харди и В. Вайнберг показали, что менделевские закономерности наследования сами по себе не изменяют частот аллелей в популяции. Этот вывод называют **законом Харди–Вайнберга**: в бесконечно большой популяции диплоидных организмов, наследование в которой определяется одним аутосомным диаллельным локусом, осуществляется случайное скрещивание (панмиксия), при отсутствии мутаций, отбора и миграции частоты генов остаются неизменными из поколения в поколение, при этом частоты генотипов связаны с частотами генов простыми соотношениями:

частота гомозигот *АА* $D = p^2$;

частота гетерозигот *Аа* – $H = 2pq$;

частота гомозигот *аа* – $R = q^2$.

Случайным скрещиванием, или **панмиксией**, называют такую систему скрещиваний в популяции, при которой вероятность формирования брачной пары не зависит от генотипов особей. Следовательно, в случайно скрещивающейся популяции частота спариваний особей тех или иных генотипов равна произведению частот, с которыми эти генотипы представлены в популяции. Например, если у самок и самцов частоты D, H и R одинаковы, частота образования пары ♀ *АА* × ♂ *АА* равна D^2, частота пары ♀ *Аа* × ♂ *аа* равна $H \times R$.

Справедливость закона Харди–Вайнберга легко доказать. Пусть частоты аллелей у самок и самцов в исходном поколении одинаковы и равны p для аллеля *А* и q для аллеля *а*. При случайном скрещивании вероятности образования зигот равны произведению частот соответствующих гамет самок и самцов. Тогда, в следующем поколении потомков с генотипом *АА* будет p^2, потомков с генотипом *аа* – q^2, потомков с генотипом *Аа* – $2pq$ (т.к. слияние женской гаметы *А* с мужской *а* дает pq гетерозигот и слияние женской гаметы *а* с мужской *А* дает также pq гетерозигот). Используя фор-

мулы разд. 17.1, вычислим частоты аллелей A и a в этом поколении. Частота аллеля A равна $p^2 + pq = p(p + q) = p$ (напомним, что $p + q = 1$). Частота аллеля a равна $q^2 + pq = q(p + q) = q$. Итак, частоты аллелей в следующем поколении оказались равными частотам в исходном поколении, и, значит, частоты генотипов во втором поколении окажутся такими же, как в предыдущем.

Из закона Харди–Вайнберга следует следующий вывод: если частоты аллелей у самцов и самок одинаковы, то при любом исходном соотношении частот генотипов равновесные частоты генотипов в каждом локусе достигаются за одно поколение. Если частоты аллелей у представителей разного пола исходно различны, то для аутосомных локусов они становятся одинаковыми в следующем поколении, поскольку и самцы и самки получают половину своих генов от отца и половину – от матери. Следовательно, в этом случае равновесные частоты генотипов достигаются за два поколения. В случае сцепленных с полом локусов равновесные частоты достигаются лишь постепенно.

Закон Харди–Вайнберга описывает поведение системы во времени при указанных выше условиях, т.е. при соблюдении всех перечисленных условий будут наблюдаться соответствующие соотношения частот аллелей и генотипов. Обратное утверждение не верно, поэтому неправомочно делать вывод о свойствах системы (моногенное наследование, отсутствие отбора и.т.д.), если в данный момент мы обнаружили в популяции соотношение трех фенотипов близкое $p^2:2pq:q^2$. Известны примеры, когда соотношение Харди–Вайнберга обнаруживается на ограниченных выборках в каждом поколении в условиях сильного давления отбора и снижения частоты одного из аллелей. Однако отклонение от соотношения Харди–Вайнберга всегда свидетельствует о некоторых процессах, происходящих в популяции.

17.3 ФАКТОРЫ ДИНАМИКИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ

Закон Харди–Вайнберга – простейшая математическая модель генетической структуры популяции. В реально существующих популяциях всегда действуют факторы, изменяющие в чреде поколений частоты аллелей и генотипов. К ним относятся отсутствие панмиксии (случайного скрещивания), ограниченная численность популяции, мутации, миграция и отбор. Основы теоретических исследований влияния факторов динамики генетической структуры и их соотношений заложены С. Райтом.

17.3.1. ОТСУТСТВИЕ ПАНМИКСИИ

В популяции могут существовать такие системы скрещиваний, при которых вероятности образования брачных пар зависят или от родственных отношений особей, или от степени их сходства. Скрещивания между родственниками называются *инбридин-*

гом. Если в популяции скрещивания между родственниками происходят чаще, чем случайно, популяция называется *инбредной*. В популяции, в которой скрещивания между родственниками происходят реже, чем случайно, осуществляется *аутбридинг*. Если вероятность образования брачных пар зависит от сходства индивидуумов по какому-либо локусу, говорят об **ассортативных скрещиваниях** в популяции. Ассортативное скрещивание, при котором вероятность образования пар между похожими особями выше, чем ожидается, называется *положительным*. Если эта вероятность ниже ожидаемой (т.е. чаще, чем случайно, скрещиваются непохожие друг на друга особи), скрещивание называют *отрицательным* ассортативным.

Уровень инбридинга в популяции зависит от географического распространения, способа размножения, поведения. Например, у многих растений семена прорастают поблизости от материнского растения, и пыльца летит на небольшое расстояние, поэтому часто происходит опыление между близкородственными особями. Самоопыление, встречающееся у многих растений, представляет собой самую крайнюю форму инбридинга. Мелкие млекопитающие, например мыши, живут в небольших семейных группах и скрещиваются внутри этих групп. Поэтому степень инбридинга в их популяциях довольно высока. У человека, напротив, как правило, существуют запреты на родственные браки, что ограничивает инбридинг. Примером положительного ассортативного скрещивания у человека может быть образование пар по цвету кожи.

Изменения генетической структуры популяции и при положительном ассортативном скрещивании, и при инбридинге одинаковы. Они не влияют на частоту аллелей, но приводят к повышению частоты гомозигот по сравнению с ожидаемым на основании закона Харди–Вайнберга. Мерой степени инбридинга служит коэффициент инбридинга F, представляющий собой вероятность того, что у какой-либо особи в данном локусе окажутся идентичные по происхождению аллели. Вычислим коэффициент инбридинга для потомка IV-1 (вероятность того, что он будет гомозиготен по какому-либо аллелю, полученному от прадедушки I-1 или прабабушки I-2 от брака между двоюродными братом и сестрой (рис. 17.1). Предположим, что индивидуумы I-1 и I-2 не имеют общих родственников, и следовательно, несут в локусе *A* разные по происхождению аллели. Обозначим генотип I-1 как A_1A_2, и генотип I-2 - A_3A_4. Какова вероятность для IV-1 быть гомозиготой, например, A_1A_1. Вероятность того, что I-1 передаст аллель A_1 своему потомку II-2 или II-3 равна 1/2. Если II-2 получил аллель A_1, то вероятность передать его потомку III-1 равна 1/2, следовательно, вероятность того, что III-1 несет аллель A_1 равна 1/4. Вероятность того, что III-1 передаст аллель A_1 своему потомку IV-1, равна 1/2. Таким образом, вероятность того, что IV-1 получил аллель A_1 от прадедушки I-1 на пути I-1–II-2–III-1–IV-1 равна 1/8, или $(1/2)^3$. Рассуждая подобным образом, получим, что для потомка IV-1 вероятность получить аллель A_1 на пути I-1–II-3–III-2–IV-1 также равна 1/8. Значит, вероятность того, что IV-1 гомозиготен по аллелю A_1 равна $1/8 \times 1/8 = 1/64$. Вероятность того, что этот потомок IV-1 может быть гомозиготен по каждому из аллелей предков I-1 и I-2 A_2, A_3 и A_4 также равна 1/64. И наконец, вероятность того, что IV-1 гомозиготен по любому аллелю предков I-1 и I-2 (коэффициент инбридинга) равна сумме вероятностей гомозиготности по каждому аллелю: $1/64 + 1/64 + 1/64 + 1/64 = 1/16$. Нет необходимости каждый раз вычислять коэффициент инбридинга таким способом,

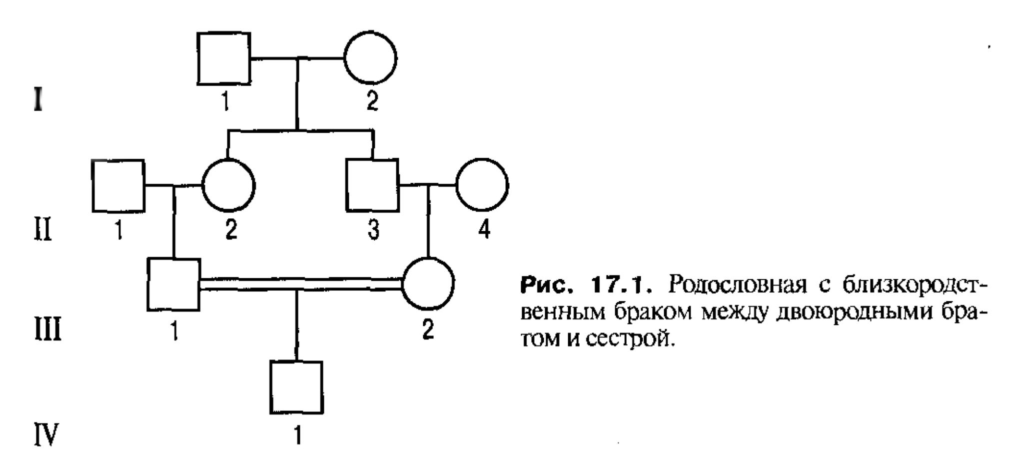


Рис. 17.1. Родословная с близкородственным браком между двоюродными братом и сестрой.

так как можно пользоваться формулами или таблицами, составленными для разных типов близкородственных браков.

17.3.2. ДРЕЙФ ГЕНОВ

Изменение частот аллелей в ряду поколений в силу случайной ошибки выборки называется случайным дрейфом генов, или просто **дрейфом генов**, или генетическим дрейфом, или генетико-автоматическими процессами. В начале 30-х гг. Н.П. Дубинин и Д.Д. Ромашов и С. Райт показали, что дрейф генов приводит к изменению частот аллелей в популяциях конечной численности.

Численность популяции, какой бы большой она ни была, всегда конечна. В популяциях конечной численности даже при отсутствии действия всех других факторов динамики генетического состава всегда будет происходить изменение частоты аллеля от поколения к поколению в силу существования ошибки выборки. Эти изменения случайны, в каждом последующем поколении частота аллеля может увеличиваться или уменьшаться по сравнению с предшествующим. В популяции нет никаких сил, возвращающих частоту аллеля к исходному значению, говорят, что популяция «не имеет памяти» о том, в каком состоянии она находилась много поколений назад. Конечным результатом таких случайных флуктуаций частоты аллеля в каждом поколении является фиксация одного из аллелей, т.е. частота аллеля *A*, например, может в конце концов достигнуть значения $p = 1$ или $p = 0$. Такие частоты аллелей означают, что все особи в популяции становятся гомозиготными или *AA* или *aa*, и, значит, дальнейшее изменение частоты становится возможным только за счет возникновения новых аллелей *A* или *a* (например, за счет новых мутаций).

Величина ошибки выборки обратно пропорциональна величине выборки, следовательно, изменение частоты аллеля будет происходить тем быстрее, чем меньше численность популяции.

Эффект основателя – одна из форм дрейфа генов. Если небольшая группа индивидуумов покидает большую популяцию и основывает новую колонию, случайно в ней может оказаться совершенно иная частота аллеля, чем в исходной популяции.

Кроме того, в течение первых поколений на новом месте численность популяции остается небольшой, и эффекты дрейфа генов сильно сказываются в ней. Это может привести к тому, что частота аллеля в новой популяции будет значительно отличаться от частоты в исходной популяции. Сейчас предполагают, что почти полное отсутствие группы крови В среди американских индейцев объясняется именно эффектом основателя, когда их немногочисленные предки пересекли Берингов пролив примерно 10000 лет назад в конце последнего оледенения.

Одним из результатов дрейфа генов является то, что большинство вновь возникших мутаций, даже если они нейтральны, практически не имеют шансов сохраниться в популяции. В популяции численностью N вероятность того, что вновь возникшая мутация будет утрачена, равна (2N – 1)/2N. Но если она сохранится, вероятность того, что она распространится в популяции и частота ее достигнет 1, равна 1/2N.

17.3.3. МУТАЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС

Частота спонтанных мутаций низка, поэтому изменение частоты аллеля только в результате мутационного процесса происходит чрезвычайно медленно. Обозначим частоту аллеля *A* в поколении *t* как p_t, и частоту мутаций $A \to a$ за поколение – μ. Тогда частота аллеля *A* в следующем $t + 1$ поколении будет равна

$$p_{t+1} = p_t - \mu p_t = p_t(1 - \mu).$$

Изменение частоты аллеля за одно поколение составит

$$\Delta p = p_{t+1} - p_t = p_t - \mu p_t - p_t = -\mu p_t$$

Эта формула показывает, что частота аллеля *A* уменьшается пропорционально частоте мутаций и частоте этого аллеля в популяции. Следовательно, изменение частоты за поколение будет падать по мере уменьшения частоты аллеля. Если темп мутирования аллеля *A* составляет 10^{-5} на одну гамету за поколение, то для того чтобы частота аллеля *A* уменьшилась с 1 до 0,99 потребуется 1 000 поколений, для уменьшения частоты аллеля *A* с 0,5 до 0,49 (на ту же величину 0,01) потребуется 2 000 поколений. Даже увеличение темпа мутирования вдвое не ускорит значительно процесс изменения частоты аллеля.

17.3.4. МИГРАЦИИ

Если в соседних популяциях частоты аллеля *A* различны, при миграции особей из одной популяции в другую будет происходить изменение частоты аллеля в популяции, принимающей мигрантов. Пусть в поколении t частота аллеля *A* в популяции составляет *p*, а в популяции из которой приходят мигранты *P*; доля мигрантов в популяции равна *m*, доля постоянных жителей – (1– *m*). Тогда, в следующем *t* + 1 поколении частота аллеля будет равна

$$p_{t+1} = (1 - m)p_t + mP = p_t - mp_t + mP = p_t + m(P - p_t)$$

и изменение частоты за одно поколение составит

$$\Delta p - p_{t+1} - p_t = p_t + m(P - p_t) - p_t = m(P \quad p_t)$$

Очевидно, что изменение частоты аллеля пропорционально разности частот в соседних популяциях и доле мигрантов. Эти величины могут быть велики, и, следовательно, частота аллеля вследствие миграции может значительно измениться.

Если миграция происходит в течение нескольких поколений, суммарное изменение частоты за эти поколения можно приблизительно оценить по формуле

$$\Delta p = M(P - p_0),$$

где M – сумма долей мигрантов за все поколения, P – частота аллеля в популяции-доноре, p_0 – исходная частота аллеля в популяции-реципиенте. Тогда,

$$M - \Delta p/(P - p_0)$$

Используя эту формулу можно оценить интенсивность миграции в популяции. Например, в Америке происходила «миграция» генов европейцев в популяцию африканцев, привезенных в качестве рабов. В штате Джорджия частота аллеля *Fy* (группа крови Даффи) среди белого населения равна 0,42, среди афроамериканцев – 0,046. В африканских популяциях она равна 0. Следовательно, миграция этого гена из популяции белых с восемнадцатого века, когда негры были завезены в Америку, равна

$$M = \Delta p/(P - p) = (0{,}046 - 0)/(0{,}42 - 0) = 0{,}1095$$

17.3.5. ОТБОР

Индивидуумы, которые лучше удовлетворяют требованиям среды, имеют больше шансов выжить в борьбе за существование и оставить потомков. В этом суть постулированного Чарльзом Дарвином естественного отбора.

17.3.5.1. ПОНЯТИЕ О ПРИСПОСОБЛЕННОСТИ И КОЭФФИЦИЕНТЕ ОТБОРА

Относительная вероятность выживания и оставления потомков для определенных фенотипов и генотипов называется *дарвиновской приспособленностью* (обозначается

буквой W). Приспособленность служит оценкой средней выживаемости и интенсивности размножения, так как индивиды, имеющие совершенно одинаковые генотипы и живущие в совершенно одинаковых условиях внешней среды, могут различаться по выживаемости и по числу потомков. Приспособленность генотипа формируется как следствие всех фенотипических эффектов исследуемого гена. Если какой-либо аллель повышает вдвое плодовитость, но снижает на 10% продолжительность жизни, он все же обеспечивает бóльшую приспособленность, несмотря на уменьшение продолжительности жизни.

Многие наследственные заболевания могут служить примером снижения приспособленности вследствие локального микронарушения хромосомы. Например, ген мышечной дистрофии Дюшенна, локализованный в Х-хромосоме, приводит к смерти в раннем возрасте, следовательно, приспособленность гемизигот по этому гену равна нулю. Заболевание серповидноклеточная анемия вызвано гомозиготностью по рецессивной мутации гена, кодирующего β-цепь гемоглобина. Приспособленность гомозигот Hb^SHb^S, несмотря на лечение, чрезвычайно низка, так как они страдают тяжелой формой анемии. При нормальных условиях среды приспособленность гомозигот по нормальному аллелю Hb^AHb^A и гетерозигот Hb^AHb^S практически равны. Однако в районах распространения малярии приспособленность гетерозигот выше, чем у нормальных гомозигот, так как наличие измененного гемоглобина в крови защищает их от малярии.

С приспособленностью связан другой параметр, характеризующий отбор, – *коэффициент отбора* $s = 1 - W$. От величины коэффициента отбора зависит скорость уменьшения частоты того или иного генотипа.

17.3.5.2. ВЛИЯНИЕ ОТБОРА НА ГЕНЕТИЧЕСКУЮ СТРУКТУРУ ПОПУЛЯЦИИ

Отбор в большой популяции ведет к увеличению частот генотипов с высокой приспособленностью и повышению средней приспособленности популяции. Рассмотрим последствия отбора в панмиктической популяции. В момент образования зигот соотношение частот генотипов соответствует ожидаемому на основании закона Харди–Вайнберга:

Генотипы	*AA*	*Aa*	*aa*
Частоты	p^2	$2pq$	q^2

Если разные генотипы имеют разные приспособленности (вероятности дожить до репродуктивного возраста и оставить потомство) – W_{AA}, W_{Aa} и W_{aa}, среди потомства достигшего репродуктивного возраста частоты генотипов составят:

Генотипы	*AA*	*Aa*	*aa*
Частоты	p^2W_{AA}	$2pq\ W_{Aa}$	q^2W_{aa}.

Так как величины W меньше 1, сумма частот генотипов после действия отбора не равна единице. Чтобы нормализовать новые частоты генотипов надо частоту каждого

генотипа разделить на сумму частот генотипов $W = p^2W_{AA} + 2pq\,W_{Aa} + q^2W_{aa}$. Величину W называют средней приспособленностью популяции, так как она равна сумме приспособленностей всех особей популяции. Тогда, выражение

$p^2W_{AA}/W + 2pq\,W_{Aa}/W + q^2W_{aa}/W = 1$.

Теперь можно найти частоту аллеля *a* в популяции после отбора q':

$$q' = R + 1/2H = q^2W_{aa}/W + pq\,W_{Aa}/W = q(qW_{aa} + pW_{Aa})/W.$$

Изменение частоты аллеля за одно поколение составит

$\Delta q = q' - q = pq[p(W_{Aa} - W_{AA}) + q(W_{aa} - W_{Aa})]/W.$

Это означает, что скорость изменения частоты аллеля зависит не только от соотношения приспособленностей, но и от частот аллелей в популяции. При низкой частоте аллеля *a* произведение *pq* близко 0, и скорость изменения частоты будет мала. По мере увеличения частоты скорость изменения будет возрастать, а затем снова упадет, когда частота *q* приблизится к 1, а *p* — к 0. Подставляя в последнюю формулу значения приспособленностей получим оценки изменения частот аллелей для нескольких частных случаев: гомозиготы по рецессивному аллелю не оставляют потомков, гетерозиготы имеют наименьшую и наибольшую приспособленность.

Отбор против рецессивных гомозигот. Как будет меняться частота вредного рецессивного аллеля, если гомозиготы *aa* не оставляют потомства? С этой ситуацией мы сталкиваемся в случае многих болезней обмена, обусловленных рецессивным геном. Гомозиготы и гетерозиготы имеют нормальную приспособленность. Тогда

Генотип	*AA*	*Aa*	*aa*
Приспособленность	1,0	1,0	0

$$q' = R + 1/2H = q^2W_{aa}/W + pq\,W_{Aa}/W = q(pW_{Aa} + qW_{aa})/W =$$
$$= q(p \times 1 + q \times 0)/(p^2 + 2pq + q^2 \times 0) = pq/p(p + q + q) = q/(1 + q).$$

Изменение частоты аллеля за одно поколение составит:

$$\Delta q = q' - q = pq[p(W_{Aa} - W_{AA}) + q(W_{aa} - W_{Aa})]/W =$$
$$= pq[p(1 - 1) + q(0 - 1)]/(p^2 + 2pq + q^2 \times 0) = pq(-q)/p(1 + q) = -q^2/(1 + q).$$

Подставляя последовательно значения *q*' для определения частоты в следующем поколении, получим частоту аллеля *a* в поколении *t* равной

$q_t = q_0/(1 + tq_0)$, где q_0 — начальная частота аллеля.

По этой формуле можно определить необходимое число поколений для любого заданного снижения частоты аллеля (табл. 17.2). Так, для того чтобы частота вредного аллеля снизилась в два раза необходимо $1/q_0$ поколений. Если частота какого-либо аллеля в популяции человека составляет 0,01, потребуется 100 поколений (2500 лет), чтобы частота аллеля оказалась равной 0,005. Таким образом, изменение частоты рецессивного аллеля даже при столь интенсивном отборе происходит чрезвычайно медленно.

Отбор против гетерозигот. В некоторых случаях гетерозиготы обладают более низкой приспособленностью, чем обе гомозиготы. С такой ситуацией мы сталкиваемся,

Таблица 17.2. Число поколений, необходимое для определенного снижения частоты аллеля при разных значениях приспособленности (По: Айала, Кайгер, 1988)

Снижение частоты аллеля	Число поколений			
	$W = 0$	$W = 0{,}5$	$W = 0{,}9$	$W = 0{,}99$
От 0,99 до 0,5	1	11	56	556
От 0,5 до 0,10	8	20	102	1020
От 0,10 до 0,01	90	185	924	9240
От 0,01 до 0,001	900	1805	9023	90231

например, при несовместимости матери и плода по резус-фактору. Рассмотрим частный случай, когда приспособленности гомозигот равны.

Генотип	AA	Aa	aa
Приспособленность	1,0	W_{Aa}	1,0

Теперь можно найти частоту аллеля a в популяции после отбора q', обозначив $W_{Aa} = 1 - s$:

$$q' = R + 1/2H = (q^2 W_{aa} + pqW_{Aa})/W = (q^2 1 + pqW_{Aa})/(p^2 1 + 2pq\, W_{Aa} + q^2 1) =$$
$$= (q^2 + pq(1 - s))/(p^2 1 + 2pq\,(1 - s) + q^2 1) =$$
$$= (q^2 + pq - spq)/(p^2 + 2pq - 2spq + q^2) = (q - spq)/(1 - 2spq).$$

Изменение частоты аллеля за одно поколение составит

$$\Delta q = q' - q = spq(q - p)/(1 - 2spq).$$

Популяция будет находиться в равновесии (изменение частот аллелей $\Delta q = 0$), если $q = p$. Это равновесие неустойчиво. Если q в силу каких-либо причин станет больше p, Δq будет положительно, и следовательно, частота аллеля a будет возрастать до тех пор пока частота его не станет равной 1. Если q меньше p, Δq будет отрицательно, и следовательно, частота аллеля a будет падать.

Если приспособленности гомозигот не равны, популяция также может находиться в состоянии неустойчивого равновесия, однако равновесные частоты аллелей будут также не равны.

Преимущество гетерозигот. В этом случае максимальную приспособленность $W_{Aa} = 1$ имеют гетерозиготы. Отбор в пользу гетерозигот приводит к устойчивому равновесию частот аллелей в популяции и созданию балансированного полиморфизма.

Генотип	AA	Aa	aa
Приспособленность	W_{AA}	1,0	W_{aa}
	$1 - s_1$,	1,0	$1 - s_2$.

Теперь можно найти частоту аллеля a в популяции после отбора q':

$$q' = R + 1/2H = (q^2 W_{aa} + pqW_{Aa})/W = [q^2(1 - s_2) + pq]\,/\,[p^2(1 - s_1) + 2pq + q^2(1 - s_2)]$$
$$= (q - s_2 q^2)/(1 - s_1 p^2 - s_2 q^2).$$

Изменение частоты аллеля за одно поколение составит

$$\Delta q = q' - q = pq(s_1 p - s_2 q)/(1 - s_1 p^2 - s_2 q^2),$$

Равновесие наступает, когда $\Delta q = 0$. Если p и q не равны нулю, это наблюдается при условии, что $s_1 p - s_2 q = 0$. Следовательно, равновесные частоты аллелей a и A равны

$$q = s_1/(s_1 + s_2) \quad \text{и} \quad p = s_2/(s_1 + s_2).$$

Равновесные частоты при преимуществе гетерозигот зависят только от соотношения коэффициентов отбора и приспособленностей. Если частота аллеля A по каим-либо причинам станет больше равновесной, т.е. р больше $s_2/(s_1 + s_2)$, то $(p - s_2q)$ будет положительно, и следовательно Δq также положительно. Таким обзом, частота аллеля a будет возрастать, а частота аллеля A – уменьшаться до тех ор, пока система не вернется к равновесию. Если же частота р меньше равновесой, то изменение частоты Δq будет отрицательным, и следовательно, частота аллея a будет уменьшаться, а частота аллеля A – возрастать пока не восстановится равовесие. Примером такого полиморфизма в популяциях человека, связанного с премуществом гетерозигот, является уже упоминавшаяся серповидноклеточная анемия, распространенная в некоторых странах Азии и Африки.

17.4. ВНУТРИПОПУЛЯЦИОННЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ГРУЗ

Под полиморфизмом понимают сосуществование в пределах одной популяции в течение достаточно длительного времени двух или более генетически определенных форм, при этом частота наиболее редкой из них не объясняется спонтанным мутационным процессом.

К поддержанию устойчивого полиморфизма в популяции могут приводить разные формы отбора. Одна из них – отбор в пользу гетерозигот, рассмотренный выше. Другие механизмы поддержания полиморфизма - это изменения направления отбора на разных стадиях жизненного цикла; отбор, зависящий от частоты; гетерогенность среды обитания и межпопуляционная миграция. Н.В. Тимофеевым-Ресовским исследован полиморфизм по окраске надкрылий у божьей коровки, связанный с изменениями приспособленности особей в летнее и зимнее время. Такой же механизм поддержания полиморфизма по инверсиям описан Ф. Добжанским в популяциях *Drosophila pseudoobscura*.

Исследования полиморфизма белков в популяциях человека показали, что не менее 30% локусов можно отнести к полиморфным системам. Генетическая гетерогенность популяций человека беспредельно велика, она приводит к тому, что каждый человек генетически уникален. Одинаковых по генотипу людей не было на протяжении всей истории человечества.

Не все генотипы в популяции имеют одинаково высокую приспособленность. Появление в популяции особей с низкой приспособленностью возможно за счет постоянно возникающих мутаций, при отборе в пользу гетерозигот, за счет инбридинга и др. Все это приводит к тому, что средняя приспособленность популяции оказывается ниже максимальной. Величину $(W_{max} - W)/W_{max}$, показывающую, на сколько средняя приспособленность ниже оптимальной для популяции, Кроу предложил называть генетическим грузом.

В этой главе мы рассмотрели действие каждого фактора, изменяющего соотношения частот аллелей и генотипов в популяции, отдельно от действия остальных факторов. В действительности все они действуют одновременно, усиливая или ослабляя эффекты друг друга.

глава 18

ГЕНОМИКА И ГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

XXI век несомненно войдет в историю, как век молекулярной генетики. Бурное развитие молекулярнобиологических методов, появление новых, компьютерных, подходов к анализу данных обеспечили прорыв в нашем представлении о том, как устроен и как функционирует геном. Современные геномные технологии в зависимости от целей их применения можно условно разделить на сканирующие, скринирующие, функциональные и хромосомные (картирующие) (табл.18.1). Получаемые с помощью этих методов огромные массивы данных обрабатываются с применением биоинформационных технологий. Хорошее знание основных принципов и этапов молекулярно-генетического тестирования позволяет совершенствовать существующие технологии, учитывая открывающиеся с их помощью возможности и сознавая подстерегающие на этом пути опасности.

18.1. ОСНОВНЫЕ ГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

18.1.1. МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ОБРАБОТКИ ДНК

18.1.1.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

ДНК может быть выделена из любого биологического материала: из крови и других жидкостей организма, различных типов тканей и клеток, содержащих ядра. У человека ДНК чаще всего выделяют из лейкоцитов крови. Процесс выделения ДНК состоит из нескольких этапов: быстрый лизис клеток, удаление фрагментов клеточных органелл и мембран, ферментативное разрушение и экстрагирование белков, осаждение молекул ДНК в этаноле с последующим их растворением в буферном растворе. Оценку качества выделенной ДНК проводят на основании измерения оптической плотности раствора ДНК в области белкового и нуклеинового спектров поглощения. В чистых образцах ДНК соотношение A(260)/A(280) > 1,8; где A(260) и A(280) – оптическая плотность раствора при длине волны 260 и 280 нм, соответственно.

Таблица 18.1. **Современные генетические технологии и методы**

Геномные технологии	*Методы*	
Получение и выделение ДНК	Выделение нативной ДНК	Метод фенол-хлороформной экстракции
	Синтез ДНК	Химический синтез Ферментативный синтез (полимеразно-цепная реакция)
	Получение и выделение определенных фрагментов ДНК	Методы гибридизации с ДНК-зондами Клонирование
Сканирующие (поиск новых аллелей/генов, полиморфизмов)	Определение нуклеотидной последовательности	Секвенирование
	Методы детекции точковых мутаций	Анализ конформационного полиморфизма одноцепочечной ДНК (SSCP) Денатурирующий гель-электрофорез Гетеродуплексный анализ Химическое расщепление некомплементарных сайтов
	Методы, основанные на полиморфизме генома	Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов Анализ мини- и микросателлитных маркеров
	Анализ продуктов генов	Тест на укороченный белок Масс-спектрометрия
	Биоинформационные технологии	Технология микрограмм (ДНК-чипы)
Скринирующие (детекция известных генов/аллелей)	Аллель-специфическая гибридизация/амплификация Капиллярный денатурирующий гель-электрофорез Минисеквенирование в твердой фазе Олигонуклеотид-лигазный анализ (OLA)	
Функциональные	Изучение транскриптов	Технология микрограмм (экспрессионные РНК-чипы)
	Изучение продуктов гена	Двухмерный электрофорез Многомерная хроматография Изотопно-меченные афинные мишени (ICAT-технологии) Масс-спектрометрия (матричная лазерная десорбционная ионизация (MALDI), электроспрейная ионизация (ESI)) Белковые чипы (SELDI) Интерактивные протеомные технологии (дрожжевая двухгибридная система, биомолекулярный интерактивный анализ (BIA))
	Изучение локализации транскриптов и продуктов гена	Технология микрограмм (экспрессионные РНК-чипы и белковые чипы – анализ уровня экспрессии в различных органах и тканях, определение внутри/вне клеточной локализации)

18.1.1.2. ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ДНК

Для научных исследований ДНК не только выделяют из биологического материала, но и получают синтетически при использовании ДНК-синтезаторов – приборов для автоматического синтеза ДНК. Принципиальное отличие процесса химического синтеза от биологического состоит в присоединении каждого нового нуклеотида к 5'-гидроксильному концу цепи, а не к 3'-концу.

Наиболее распространенным методом химического синтеза ДНК является фосфорамидитный (фосфиттриэфирный) метод. Для синтеза используют модифицированные дезоксирибонуклеозиды. Для предотвращения неспецифического взаимодействия 5'-гидроксильной группы первого нуклеотида до добавления в реакционную смесь второго нуклеотида ее защищают с помощью диметокситритильной (ДМТ) группы. Каждый последующий присоединяемый к растущей цепи нуклеотид добавляется в колонку в виде фосфорамидита, т.е. содержит ДМТ-группу и диизопропиламинную группу на 3'-фосфитной группе, защищенную метильным остатком.

Химический синтез необходим для получения одноцепочечных олигонуклеотидов длиной ≤50 п.н. Такие олигонуклеотиды используют для конструирования целых геномов и их фрагментов, в качестве праймеров для амплификации специфических последовательностей и секвенировании ДНК, для сайт-специфического мутагенеза in vitro, в качестве зондов при гибридизации и в качестве линкеров, облегчающих клонирование. Химический синтез применяют при затруднении клонирования гена (если известна аминокислотная последовательность белка). В тех случаях, когда кодоны гена плохо считываются организмом хозяина, можно синтезировать ген с таким набором кодонов (оптимизация кодонов), который сохраняет аминокислотную последовательность прежней, но транскрибируется более эффективно. Для того чтобы синтезировать ген, необходимо каждую из цепей составляющей его последовательности синтезировать отдельно. При большой протяженности гена его синтезируют отдельными фрагментами, которые впоследствии «собирают» с помощью ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы.

18.1.1.3. АМПЛИФИКАЦИЯ И РЕСТРИКЦИЯ ДНК

Все молекулярно-генетические методы основаны на использовании различных классов ферментов, два из которых имеют наибольшее значение: ДНК-полимеразы и рестриктазы (их свойства подробно описаны в гл. 9).

ДНК-полимеразы осуществляют синтез ДНК, и для их работы необходима одноцепочечная матричная ДНК с двухцепочечным участком на 3'-конце молекулы и четыре типа дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP: dATP, dCTP, dGTP и dTTP). ДНК полимеразы обладают различными видами активности, в том числе и экзонуклеазной в направлении 3' → 5', что позволяет этим ферментам репарировать дефекты образовавшиеся при синтезе ДНК. Способность ДНК-полимеразы I *E. coli* инициировать репликацию в месте разрыва ДНК и замещать гомологичный участок в двойной цепи ДНК используется для введения в ДНК меченых нуклеотидов **методом ник трансляции**, а также для заполнения брешей при сборке протяженного гена из хими

чески синтезированных олигонуклеотидных последовательностей. Основное свойство ДНК-полимераз – осуществлять синтез ДНК – используют при амплификации изучаемого фрагмента ДНК. Одним из видов амплификации является **полимеразная цепная реакция.**

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Метод ПЦР был предложен в 1983 г. американским исследователем Кари Муллисом. Суть этого метода заключается в специфической амплификации ДНК с помощью полимеразы, осуществляющей избирательный синтез взаимно комплементарных цепей ДНК, начиная с двух **праймеров** (затравок). Праймеры комплементарны противоположным цепям ДНК в участках, ограничивающих выбранную область ДНК, и ориентированы 3′-концами навстречу друг другу и в сторону той последовательности, которую необходимо амплифицировать. Длина амплифицируемого фрагмента определяется расстоянием между праймерами. Используя в качестве матрицы любые образцы ДНК, содержащие амплифицируемую последовательность, можно увеличить количество копий изучаемого фрагмента ДНК в сотни миллионов раз. Такое увеличение, позволяющее визуализировать заданный фрагмент ДНК на электрофореграмме, а также использовать продукт амплификации для дальнейшего изучения с помощью других методов, можно считать главным достоинством метода ПЦР. Основной недостаток этого метода – необходимость знания ДНК-последовательностей, фланкирующих изучаемый ген, для создания праймеров.

Для проведения специфической амплификации необходимы:

1) матричная ДНК-мишень (достаточно даже одной молекулы) длиной от 100 до ≈ 35 000 п.н.;

2) два искусственно синтезированных праймера – олигонуклеотидные последовательности длиной 15 30 п.н.;

3) термостабильная ДНК-полимераза (чаще используют ДНК-полимеразу *Thermus aquaticus*, или Taq), сохраняющая свою активность при температуре 94 °С и выше;

4) четыре дезоксирибонуклеотида.

ПЦР состоит из многократных повторений цикла, состоящего из трех этапов:

1) *денатурации* (плавления) двухцепочечных структур – перевод их в одноцепочечную форму путем нагревания до температуры 94 °С;

2) *ренатурации* или гибридизации (отжига) комплементарных участков ДНК с праймерами при температуре 37–68 °С;

3) *синтеза* последовательности, комплементарной матричной ДНК при 72 °С.

В первом цикле праймеры гибридизуются с исходной матричной ДНК и образуют так называемые «длинные матрицы». В последующих циклах праймеры спариваются с вновь синтезированными молекулами ДНК, образуя «короткие матрицы» (рис. 18.1). При этом синтез ДНК заканчивается не при изменении температурного режима, а по достижении ДНК-полимеразой границы амплифицированного участка. Скорость синтеза определяется длиной амплифицируемого фрагмента. Как правило, ПЦР включает 25–30 циклов, и к последнему циклу в реакционной смеси содержатся практически только «короткие матрицы» (амплифицируемые фрагменты).

ПЦР обычно проводят в автоматическом режиме, используя для этого специальные приборы – термоциклеры или амплификаторы ДНК, позволяющие задавать

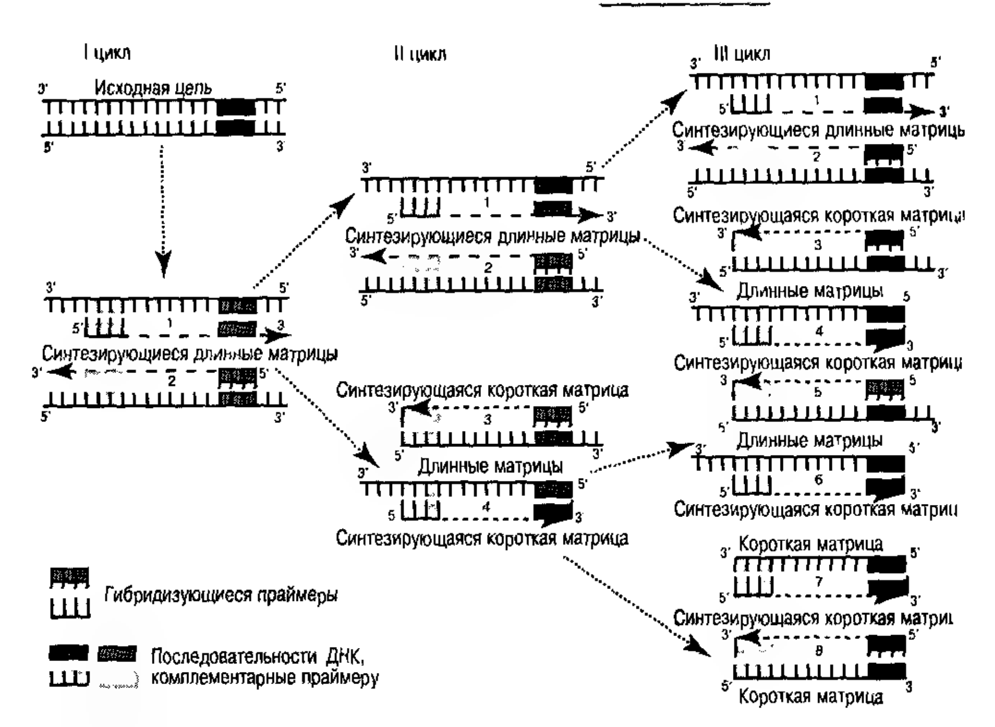


Рис. 18.1. Механизм ПЦР

нужное количество циклов и выбирать оптимальные временны́е и температурı параметры для каждого этапа цикла.

Существует ряд модификаций ПЦР, используемых в зависимости от конкрет целей проведения реакции или от метода последующего молекулярного анали а плификатов.

Одна из широко используемых модификаций ПЦР – **метод мультиплексной а плификации (МПА)**, позволяющий проводить ПЦР нескольких изучаемых фрагм тов в одной пробирке, что не только убыстряет и удешевляет анализ, но и позво рассматривать одни фрагменты, получающиеся в результате МПА, в качестве п жительного контроля реакции для других. Добавляя в реакционную смесь мече dNTP, можно при необходимости получать меченые продукты ПЦР.

Проведение ПЦР с молекулами кДНК позволяет анализировать экспрессик нов и получать большие количества кДНК.

Реакцию амплификации можно проводить непосредственно на хромосом препаратах и при использовании меченых нуклеотидов визуализировать компле тарные продуктам амплификации участки ДНК на хромосомах, (**метод PRINS** англ. *polymerase reaction* in situ).

Существуют варианты ПЦР (ассиметричная ПЦР – с избытком одного и о праймеров; ПЦР с использованием магнитных частиц с фиксированным на п верхности стрептавидином и биотиновой метки одного из праймеров), позво щие синтезировать и выделять преимущественно одноцепочечные фрагменты /

что значительно облегчает их секвенирование. В ряде случаев применяют **метод GAWTS** (от англ. *genome amplification with transcript sequences)* – амплификацию с праймерами, несущими сайт узнавания для фермента Т7-РНК-полимеразы, с последующим секвенированием одноцепочечного РНК-транскрипта, полученного из амплификата при помощи Т7-РНК-полимеразы.

Продукты ПЦР и любые другие фрагменты ДНК наблюдают в геле после проведения гель-электофореза и специфического окрашивания. При окрашивании геля бромидом этидия и просмотре в проходящем ультрафиолетовом свете места локализации ДНК выявляются в виде красной полосы.

На электрофореграмме можно определять наличие или отсутствие амплифицированного фрагмента в изучаемом образце, обусловленное протяженными делециями и структурными перестройками, регистрировать изменение его длины. Причинами отклонения в размерах синтезированных молекул могут быть: 1) инсерции или делеции нескольких нуклеотидов в исходной матричной молекуле ДНК, 2) конформационные изменения в одноцепочечных молекулах ДНК, возникающие при замене оснований, 3) структурные изменения в дуплексах между нормальными и мутантными вариантами амплифицированных фрагментов ДНК. Таким образом, ПЦР представляет собой не только метод амплификации (синтеза), но и альтернативный метод анализа геномной ДНК. Однако в некоторых случаях для установления конкретной причины выявленных на электрофореграмме отклонений в размерах полученных фрагментов ДНК необходимо дальнейшее изучение продуктов амплификации с помощью блот-гибридизации со специфическими олигонуклеотидными зондами, рестрикционного анализа, SSCP и других методов (в зависимости от цели).

Рестрикция ДНК. Рестриктазы, или рестрикционные эндонуклеазы, – ферменты, обладающие эндонуклеазной активностью и участвующие в системе распознавания и защиты «своих» и уничтожения чужеродных ДНК *in vivo*. Известно более 500 различных типов рестриктаз бактериального происхождения, каждая из которых узнает свою специфическую последовательность в двухцепочечной молекуле ДНК. Длина распознаваемого участка варьирует от 4 до 12 нуклеотидов. Обнаружив эту последовательность, рестриктаза разрезает молекулу ДНК на фрагменты в местах ее локализации, называемых *сайтами рестрикции.* Чем больше сайтов рестрикции, тем больше образуется рестрикционных фрагментов. Длина рестрикционных фрагментов зависит от распределения сайтов рестрикции в исходной молекуле ДНК: образующиеся фрагменты тем короче, чем чаще расположены эти сайты. В зависимости от частоты расположения сайтов рестрикции в молекуле ДНК выделяют три класса рестриктаз: частощепящие – как правило, узнают короткие специфические последовательности длиной в 4–5 п.н. (например, *TaqI*); среднещепящие – узнают средней длины (6–7 п.н.) специфические последовательности (например, *EcoRI*); редкощепящие узнают длинные специфические последовательности в 8–12 п.н. (например, *NotI*).

Сайты рестрикции часто используют в качестве генетических маркеров ДНК, так как образующиеся в результате рестрикции фрагменты ДНК могут быть упорядочены по длине путем электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле в зависимости от их молекулярной массы. Зная молекулярную массу фрагментов, можно определить физическое расстояние между сайтом рестрикции и концами исходного фрагмента ДНК, что является основой метода, получившего название **физического картирования** (рис. 18.2).

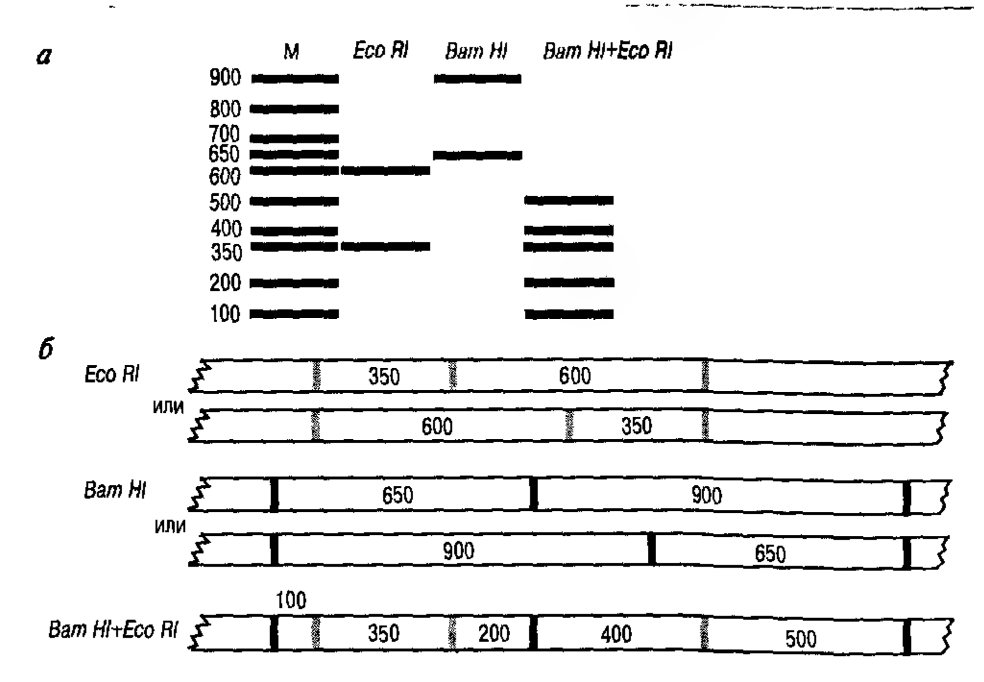


Рис. 18.2. Картирование сайтов рестрикции

а – результаты электрофоретического разделения фрагментов ДНК, полученных в результате рестрикции (М – маркер молекулярной массы; EcoRI, BamHI – рестриктазы; BamHI+EcoRI – смесь рестриктаз).

б – рестрикционная карта, построенная на основе определения длины фрагментов (п.н.), которая соответствует расстоянию между сайтами узнавания рестриктаз.

При обработке тотальной геномной эукариотической ДНК, например ДНК человека, часто- или среднещепящими эндонуклеазами образуется огромное количество фрагментов различной длины (в среднем порядка 1 млн). Разделить эти фрагменты с помощью электрофореза и визуально идентифицировать каждый из них невозможно: на электрофореграмме видна полоса, равномерно окрашенная по всей длине геля, – *шмер*. Обнаружение определенных фрагментов рестрицированной геномной ДНК на электрофореграмме возможно только путем гибридизации с мечеными ДНК-зондами.

18.1.2. МЕТОДЫ ПОИСКА, ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ОПРЕДЕЛЁННЫХ УЧАСТКОВ ДНК

Длительное время, до разработки ПЦР, единственными методами обнаружения и выделения специфических фрагментов ДНК (геномных и кДНК) с целью их последующего изучения были гибридизация с ДНК-зондами и клонирование, несмотря

на целый ряд ограничений их применения. К основным ограничениям относятся следующие: большой размер исследуемых фрагментов, значительно превосходящий длину ДНК-зондов и препятствующий прямому молекулярному анализу; невозможность произвольного выбора концов изучаемых последовательностей, определяющихся наличием соответствующих сайтов рестрикции в исходной молекуле ДНК; необходимость большого количества хорошо очищенной высокомолекулярной геномной ДНК (не менее 10 мкг на одну реакцию, что равноценно 0,5 1 мл крови), для геномной гибридизации – наличие радиоактивных ДНК-зондов с высокой удельной активностью не менее 10^9 имп./(мин·мкг), действующих ограниченный промежуток времени, и специально оборудованного изотопного блока. К тому же длительная экспозиция автографов значительно удлиняет время получения результатов.

Все это, а также большая трудоемкость исследований, ограничивают использование методов блот-гибридизации и клонирования для пренатальной диагностики плода (ответ в этом случае надо получить быстро) и диагностики наследственного заболевания при гибели больного в этом случае невозможно получить большое количество ДНК). Однако эти методы не потеряли своей актуальности и используются для картирования и изучения новых генов.

18.1.2.1. ГИБРИДИЗАЦИЯ С ДНК-ЗОНДАМИ

ДНК-зонд – одноцепочечная ДНК, длиной до 30 нуклеотидов, используемая для поиска комплементарных последовательностей в молекуле большего размера или среди множества разнообразных молекул ДНК. ДНК-зонды можно синтезировать искусственно либо выделить из генома. Затем эти последовательности клонируют, чтобы иметь возможность получать их в любое время и в неограниченном количестве.

Блот-гибридизация. Это высоко чувствительный метод идентификации специфических последовательностей ДНК. Денатурированные фрагметы ДНК переносят на плотный носитель - нитроцеллюлозный фильтр или нейлоновую мембрану. Далее фиксированную на этом носителе ДНК гибридизуют с радиоактивно меченным ДНК- или РНК-зондом. Затем положение искомого фрагмента геномной ДНК на электрофореграмме определяют методом радиоавтографии. При длительной экспозиции (в течение нескольких дней) и при высокой удельной радиоактивности ДНК-зонда (более 10^9 расп./(мин·мкг)) этот метод позволяет выявлять менее чем 0,1 пг ДНК. Этапы блот-гибридизации схематически представлены на рис. 18.3.

В зависимости от типа изучаемого вещества, способов его предварительной обработки и переноса (блоттинга) различают несколько разновидностей этого метода.

Саузери-блот, или **блот-гибридизация по Саузерну** – наиболее эффективный метод идентификации определенных молекул ДНК среди электрофоретически разделенных фрагментов, предложенный в 1975 г. Эдвардом Саузерном. Геномную ДНК обрабатывают одной или несколькими рестриктазами и образовавшиеся фрагменты разделяют по относительной молекулярной массе в агарозном или акриламидном геле. Далее фрагменты ДНК подвергают денатурации in situ и переносят с геля на плотный носитель. В данном случае блоттинг (перенос) осуществляется за счет действия капиллярных сил, электрического поля или вакуума.

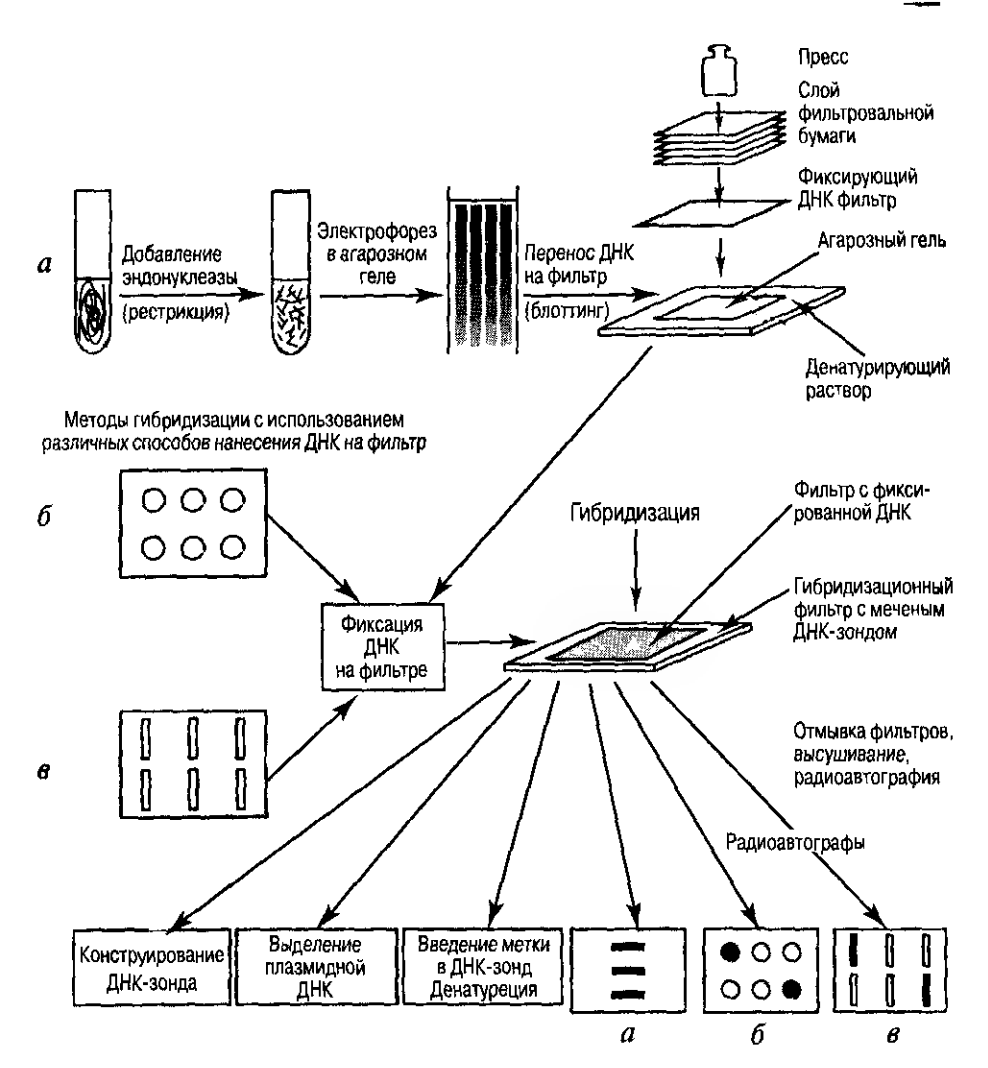


Рис. 18.3. Методика блот-гибридизации. (Из: В.Н. Горбунова, В.С. Баранов, 1997)
а – блот-гибридизация по Саузерну; б – дот-гибридизация; в – слот-гибридизация.

Методы **дот-** и **слот-гибридизации** получили свои названия в зависимости от формы анализируемого пятна ДНК на фильтре – округлой или продолговатой, соответственно. На твердую матрицу препараты ДНК и РНК наносятся капельно. Принципиальное отличие этих методов в том, что с меченым ДНК-зондом гибридизуются молекулы ДНК или РНК без предварительной обработки рестриктазами и электрофореза.

Нозерн-блот (Northern-blot) – метод гибридизации ДНК-зондов с электрофоретически разделенными молекулами РНК.

Вестерн-блот (Western-blot), или иммуноблот, – это связывание электрофоретически разделенных белков, фиксированных на фильтрах, с мечеными антителами.

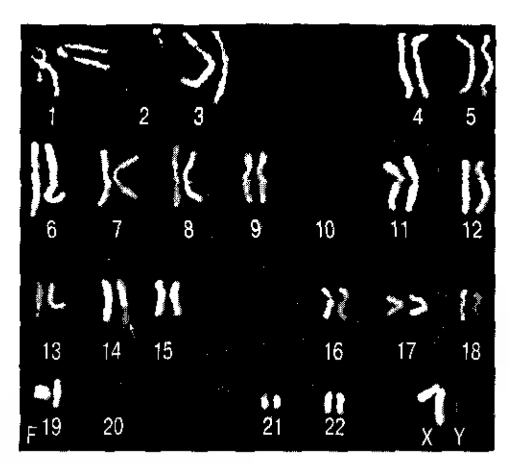


Рис. 18.4. Кариотип больного с реципрокной транслокацией t2p;14q при использовании мультиплексной FISH. (Из: T. D. Gelehrter, F.S.Collins, D.Ginsburg, 1998)

Названия двух последних методов образованы по аналогии с Саузерн-блот (*Southern-blot*). Их можно рассматривать как дань уважения сообщества молекулярных генетиков Эдварду Саузерну, внесшему неоценимый вклад в разработку методов, используемых для анализа ДНК.

Перечисленные виды блот-гибридизации имеют ряд недостатков: необходимость использования хорошо очищенных препаратов ДНК и радиоактивных зондов, длительность и трудоемкость процедуры. Все это делает данные методы весьма дорогостоящими. Тем не менее, блот-гибридизация не утратила своего значения и в настоящее время. Использование различных вариантов нерадиоактивного мечения (биотин- или флуоресцеин-меченные ДНК-зонды) или окраски ДНК нитратом серебра позволяет применять этот метод для диагностики генных болезней.

Гибридизация in situ. Метод гибридизации с ДНК-зондами на гистологических или хромосомных препаратах (т.е. метод гибридизации, не требующий предварительного выделения и очистки ДНК). В настоящее время наиболее широко используется **FISH** (от англ. *fluorescent in situ hybridization*) – вариант метода, при котором в качестве зондов используют препараты ДНК или РНК, меченные флуорохромами.

Меченый ДНК-зонд наносят на препараты дифференциально окрашенных и подготовленных для гибридизации (денатурированных) метафазных хромосом. После удаления не связавшихся молекул ДНК и специфической обработки, в зависимости от типа использованного зонда, места хромосомной локализации последовательностей ДНК, комплементарных соответствующим ДНК-зондам, наблюдают в микроскоп в виде характерных светящихся точек (рис. 18.4). Гибридизация in situ – один из наиболее эффективных методов картирования комплементарных ДНК-зонду последовательностей ДНК на хромосомах. Его применяют при исследовании распределения по геному повторяющихся последовательностей ДНК, клонированных последовательностей ДНК анонимного происхождения; при определении хромосомной принадлежности и внутрихромосомной локализации уникальных генов, взаиморасположения клонированных фрагментов ДНК даже в пределах одного хромосомного локуса. Разрешающая способность FISH-метода достигает нескольких хромосомных бэндов: при проведении гибридизации in situ на интерфазных (растянутых) хромосомах человека она может достигать 50 т.п.н., что составляет около 5% величины среднего хромосомного бэнда.

Гибридизация in situ молекул РНК с кДНК-зондами, проводимая на гистологических препаратах, эффективно используется для анализа тканеспецифического распределения и внутриклеточной локализации мРНК.

18.1.2.2. КЛОНИРОВАНИЕ: ВЕКТОРНЫЕ СИСТЕМЫ И МЕТОДЫ. СОЗДАНИЕ И СКРИНИНГ БИБЛИОТЕК ГЕНОВ

Клонирование – один из методов выделения и идентификации фрагментов ДНК, а также получения их в неограниченном количестве. Выделенные и идентифицированные фрагменты могут быть использованы для молекулярного анализа, в качестве ДНК-зондов и для создания библиотек генов. Метод был разработан на бактериях и свое название получил из-за того, что все производные одной бактериальной колонии содержат идентичные фрагменты ДНК, т.е. представляют собой *клоны*.

Клонирование фрагмента ДНК включает несколько последовательных этапов (рис. 18.5):

1) встраивание клонируемого (чужеродного) фрагмента ДНК в векторную молекулу ДНК (образование химерной молекулы – рекомбинантной ДНК);

2) проникновение этой конструкции в бактериальную клетку-хозяина;

3) идентификация клеток, содержащих рекомбинантную ДНК, и их отбор (как правило, осуществляется на селективной среде);

4) получение необходимого количества клеток, содержащих рекомбинантную ДНК (собственно клонирование). При необходимости индуцируют экспрессию клонированного гена в клетках-хозяевах и получают кодируемый им белок.

Итак, клонирование предполагает встраивание (инсерцию) экзогенной ДНК в векторную молекулу ДНК. Векторные системы, обеспечивающие доставку чужеродного фрагмента ДНК в клетку хозяина, для прокариот и эукариот различны. Для клонирования в прокариотических клетках используют плазмиды, фаги и космиды. В зависимости от типа векторной системы, используемой для доставки клонируемого фрагмента ДНК, процесс переноса генов носит название: при использовании плазмиды – **трансформации**; при использовании фага – **трансдукции**. Перенос экзо-

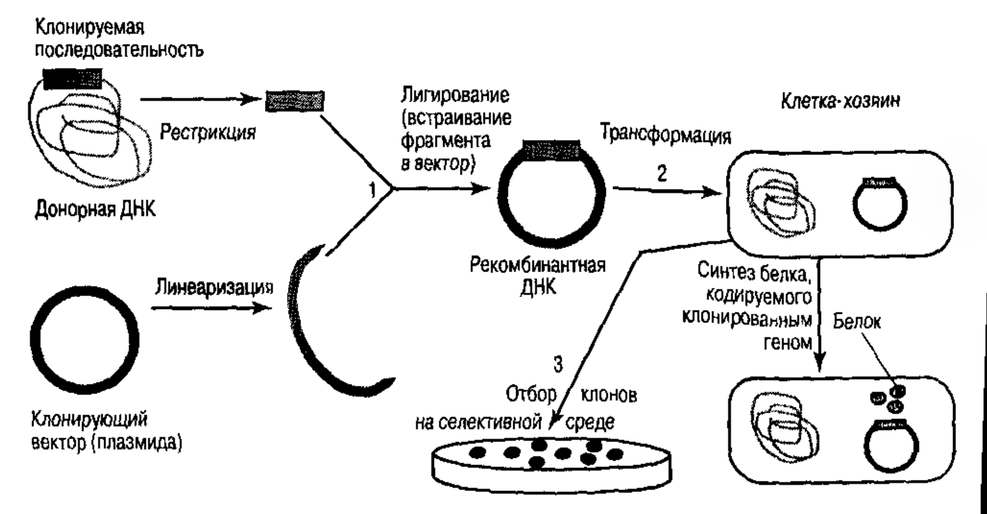


Рис. 18.5. Этапы клонирования фрагмента ДНК с использованием плазмидного вектор

генной ДНК в эукариотические клетки называют **трансфекцией**. В качестве векторов для переноса ДНК в эукариотические клетки используют дрожжевые плазмиды (единственные плазмиды, найденные в эукариотических клетках) и различные эукариотические вирусы (чаще всего ретровирусы, аденовирусы или аденоассоциированные вирусы). В ряде случаев введение векторных конструкций в эукариотические клетки осуществляют путем *ко-трансформации* – одновременного введения плазмиды и сегмента чужеродной ДНК. В клетках эукариот векторные конструкции сохраняются в виде эписом (суперскрученных кольцевых молекул) в течение нескольких дней, а иногда экзогенная ДНК интегрируется в хромосомную ДНК и устойчиво сохраняется в геноме клетки-хозяина.

Конструирование клонирующих векторов подразумевает встраивание или удаление удобных для идентификации клонов генетических элементов (специфических сайтов рестрикции, инициации и регуляции транскрипции). Например, при создании плазмидных клонирующих векторов ослабляют систему контроля репликации и добавляют или вырезают гены антибиотикоустойчивости. При формировании фаговой векторной конструкции экзогенную ДНК встраивают в район локализации маркерного гена, позволяющего вести селекцию химерных фагов по экспрессии химерного белка (часть полипептидной цепи соответствует маркерному белку, а часть информации, заключенной во встроенном фрагменте ДНК). Определение химерного белка возможно при использовании антител к фрагменту маркерного белка или участку, кодируемому чужеродной ДНК, а также путем выявления функционально активного белка после протеолитического расщепления химерного полипептида. При конструировании искусственных дрожжевых хромосом YAC (от англ. *yeast artificial chromosomes*) используют плазмидные векторы, содержащие в своем составе известные центромерные и теломерные последовательности хромосом дрожжей, необходимые для поддержания репликации векторов в клетках хозяина. Характеристики клонирующих векторов представлены в табл. 18.2.

Некоторое время идентификация нужных геномных клонов проводилась очень трудоемкими методами – «прогулки» и «прыжков по хромосоме». Их этапы схематически представлены на рис. 18.6.

«Прогулка по хромосоме», или скользящее зондирование, заключается в последовательном отборе клонов, несущих перекрывающиеся в концевых участках фрагменты ДНК из определенной области генома. Выделив клоны, например, путем скрининга библиотеки с помощью маркерной ДНК, сцепленной с нужным геном, их используют в качестве ДНК-зондов для поиска других клонов с перекрывающимися последовательностями. В результате получают набор фрагментов, полностью перекрывающих область поиска гена, – *контиги*. С помощью методов физического картирования устанавливают размер перекрывающихся участков (в п.н.) и строят физическую карту данной области. Несмотря на то, что прогулку можно осуществлять в двух направлениях, при использовании рестрикционной карты, эффективность этого метода мала. При использовании космидных библиотек каждый шаг зондирования в одном направлении равен 20 т.п.н. (0,02Мб), а из-за наличия в геноме повторяющихся и трудно клонируемых последовательностей можно пройти около 200–300 т.п.н. (0,2–0,3 Мб).

Метод клонирования способом **«прыжков по хромосоме»** позволяет идентифицировать участки, отстоящие друг от друга на сотни тысяч нуклеотидов, не выделяя

Таблица 18.2. **Характеристика клонирующих векторов**

	Вектор	Длина ДНК вектора, п.н.	Размер клонируемых вставок, п.н.	Применение	Примеры
Прокариотические	1. Плазмиды	от 10^3	до 5×10^3	Создание библиотек кДНК	PBR322, ColE1 F-плазмида
		до $>5 \times 10^5$	$1{,}5\text{-}3 \times 10^5$	Клонирование крупных фрагментов	
	2. Фаги		$\leqslant 2 \times 10^4$	Создание геномных и кДНК-библиотек	λ – λgt 10, λgt 11, λZap.
	3. Космиды	$5\text{–}10 \times 10^3$	$\leqslant 4 \times 10^4$	Создание геномных библиотек	pLFR-5
Эукариотические	1. Дрожжевые - минихромосомы (YAC)		$>10^5\text{–}10^6$	Клонирование субхромосомных фрагментов ДНК, содержащих целые гены. Создание геномных библиотек	
	2. Вирусы				
	ретровирусы		8 т.п.н.		
	аденовирусы		8 т.п.и.		
	аденоассоциированные		2 -5 т.п.н.	Генотерапия	
	Herpes symplex	152 т.п.н.	30 т.п.н.		

промежуточную последовательность. Для создания библиотеки генов методом «прыжков по хромосоме» проводят рестрикцию геномной ДНК редкощепящей рестриктазой (как правило, наиболее удобен фермент, сайты рестрикции которого находятся на расстоянии примерно 200 т.п.н. – длина прыжка). Эти фрагменты сшивают с небольшим маркерным геном, как правило с геном *supF* (длина ≈7 т.п.н.) фага λ, что приводит к циклизации фрагмеита. В результате этого концевые участки, исходно находившиеся на расстоянии несколько сотен т.п.н. удалены друг от друга лишь на длину маркерного гена. Обработав кольцевые молекулы среднещепящей рестриктазой (наиболее часто используют *EcoR1*), отбирают фрагменты длиной примерно 20 т.п.н., среди которых и содержащие маркерный ген и фланкирующие его последовательности. При встраивании в вектор амплифицироваться в клетках-хозяевах отрицательных по маркерному гену будут только последовательности, содержащие этот ген. Далее идентифицируют клон методом гибридизации с ДНК-зондом, специфичным для исходной последовательности. При последующем субклонировании в плазмидном векторе получают два субклона. Один субклон гибридизуется с ДНК-зондом, специфичным для исходной последовательности, второй - ие гибридизуется с этим ДНК-зондом и содержит фрагмент ДНК, отстоящий от начала исходной молекулы на длину прыжка.

После создания геномных библиотек, содержащих большие фрагменты ДНК, и построения карт контиг методы «прогулки» и «прыжков по хромосоме» утратили свою актуальность.

Библиотеки генов и их скрининг. На основе технологии клонирования, позволяющей обнаруживать определенный фрагмент ДНК и получать его в необходимом ко-

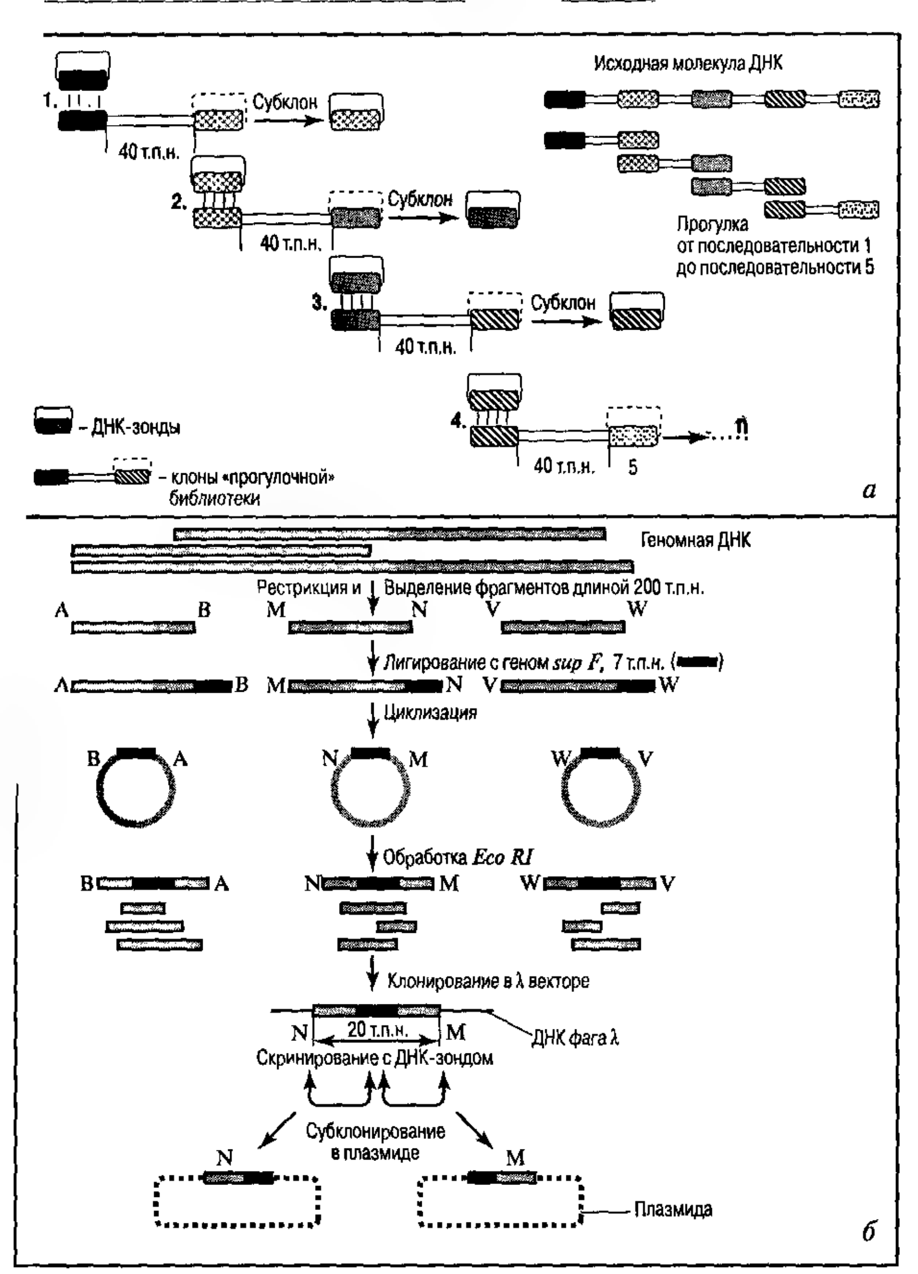


Рис. 18.6. Принципиальная схема методов клонирования путем «прогулки» (*а*) и «прыжков» (*б*) по хромосоме

а – для создания каждого последующего зонда гибридизовавшуюся последовательность субклонируют и строят ее рестрикционную карту. С помощью созданного зонда выбирают следующую последовательность. В результате получают ряд перекрывающихся последовательностей общей длиной 40 т.п н .x **n**, исключая перекрывающийся участок между ними (зонд). Четыре таких фрагмента охватывают примерно 160 п.н. б – см объяснение в тексте.

личестве, сконструированы библиотеки генов, служащие источником различных фрагментов ДНК. **Библиотека генов** – это полный набор клонированных перекрывающихся ДНК-фрагментов, которые получены в результате рестрикции или механического разрезания исходной молекулы ДНК, выделенной из какого-либо биологического материала (тканей, культур клеток, отдельной хромосомы или из ее фрагментов). Количество различных клонов, или *информационная емкость библиотеки,* зависит от размера исходной ДНК (генома) и обязательности присутствия каждого фрагмента хотя бы в одном клоне. Оптимальный размер перекрывающихся фрагментов для клонирования при создании библиотеки генов должен соответствовать среднему размеру гена того вида или типа живых организмов (для млекопитающих – 15–25 т.п.н.), для которого она создается.

Библиотека может содержать всю геномную ДНК данного вида (экзоны, интроны и межгенные участки) или только кодирующие последовательности.

Библиотеки, созданные на основе тотальной геномной ДНК и включающие экзоны, интроны и межгенные участки называют *геномными*. Информационная емкость геномных библиотек млекопитающих составляет не менее $8 \cdot 10^5 – 10^6$. Фрагменты оптимального размера из геномной ДНК человека получают при рестрикции частощепящими рестриктазами Sau 3A или MboI.

Библиотеки кДНК состоят только из экзонов. Их конструируют из кДНК, полученной с помощью обратной транскрипции мРНК, которая выделена из биологического материала, экспрессирующего изучаемые гены. Различают библиотеки экспрессирующихся кДНК и селективных кДНК.

Получив ДНК/кДНК, ее разрезают на фрагменты, длина которых зависит от выбранного клонирующего вектора, и конструируют векторную систему. В зависимости от выбранного для клонирования вектора различают YAC-, BAC (*bacterial artificial chromosomes*)- и PAC (*plasmid artificial chromosomes*)-библиотеки, содержащие крупные фрагменты ДНК человека. Фаговые (P1 и λ) и космидные библиотеки генов наиболее удобны для хранения больших количеств химерных ДНК. Для создания библиотек генов в основном используют фаговые, космидные и YAC-системы. YAC-библиотеки генов представляют собой фрагменты геномной ДНК человека размером до 1 млн п.н., «сшитые» с центромерными районами хромосом дрожжей. После идентификации необходимого клона YAC-библиотеки вставочный участок может быть субклонирован в фаговых или космидных библиотеках. Наиболее удобно библиотеки генов человека конструировать, используя клонирующие векторы на основе фага λ – EMBL3 и EMBL4. Это обусловлено характеристиками векторов: интервалом пакующей способности – 9–23 т.п.н.; наличием большого количества удобных клонирующих сайтов (что позволяет использовать разные рестриктазы при получении фрагментов ДНК для инсерции); отсутствием последовательностей плазмид pBR322 и *Col*E1, наиболее часто используемых для клонирования (что позволяет проводить отбор нужных клонов с помощью фаговой ДНК, не вырезая вставку).

Скринируя библиотеки генов, осуществляют поиск нужных последовательностей ДНК. Выбор метода скрининга зависит от специфических особенностей этих последовательностей. Для скрининга библиотек, как правило, используют блот-гибридизацию с ДНК-зондами (олигонуклеотидными, кДНК- и другими) или иммунноблот со специфическими антителами (если библиотека сконструирована на основе экс-

рессирующего вектора). Скрининг включает несколько последовательных этапов: высевание химерных фагов библиотеки на газон бактерий, растущих на поверхности твердой питательной среды в чашках Петри (каждая литическая бляшка на бактериальном газоне — результат инфицирования клеток одним клоном фага); «перепечатывание» полученных культур на другие чашки Петри с целью их дублирования; перенос растущих и лизированных исходных колоний на фильтр с одновременным нарушением клеточных мембран, фиксированием белков и ДНК; блот-гибридизация с меченым ДНК-зондом или иммуноблот с мечеными антителами (для экспрессионных библиотек). Заключительный этап скрининга включает выявление положительных колоний фагов методом радиоавтографии (после удаления несвязавшихся ДНК-зондов и антител темные пятна на рентгеновской пленке обнаружатся в местах локализации колоний, содержащих комплементарный зонду фрагмент ДНК, или специфический антиген) и их отбор на дублированных культурах. С целью избежания ошибок проводят неоднократный скрининг отобранных колоний. Далее для получения достаточного количества отобранного фрагмента с целью его исследования или использования в качестве ДНК-зонда его субклонируют в плазмидном векторе.

18.1.2.3. МЕТОДЫ ПОИСКА ДНК-ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ОСНОВАННЫЕ НА ПОЛИМОРФИЗМЕ ГЕНОМА

Последовательности ДНК человека идентичны между собой на 99,8%, однако, оставшиеся 0,2% генома человека характеризуются значительной вариабельностью. Исследования генома, позволившие установить наличие вариабельных участков, а также широкое внедрение метода ПЦР, позволили разработать более легкие методы идентификации фрагментов ДНК, основанные на полиморфизме генома. Эти методы имеют ряд преимуществ: 1) можно использовать один и тот же (универсальный) набор праймеров, 2) нет необходимости в ДНК-зондировании, гибридизации и т.д., 3) возможность автоматизации анализа результатов. Все это позволяет быстро охарактеризовать большое количество образцов.

Как известно, полиморфизм генома обусловлен, главным образом, наличием полиморфных локусов, представляющих собой нейтральные мутации, не проявляющиеся фенотипически и не влияющие на жизнеспособность и репродуктивные свойства особей (гл. 13). Такие локусы сконцентрированы в некодирующих областях генома человека, более подверженных изменчивости, чем кодирующие участки. Наследование полиморфных локусов подчиняется менделевским закономерностям. Информативность полиморфных локусов определяется уровнем их генетической изменчивости в различных популяциях.

С помощью молекулярных методов анализа наиболее просто выявляются два типа геномного полиморфизма: 1) *количественные изменения мини- и микросателлитных последовательностей ДНК* (уменьшение или увеличение числа повторов), создающие целую серию уникальных по характеру и частоте аллелей для каждого вариабельного локуса, и 2) *качественные замены отдельных нуклеотидов, обусловливающие*

появление полиморфных сайтов рестрикции. Эти типы полиморфных локусов представляют собой наиболее удобные генетические маркеры. Анализируя родословные можно проследить наследование аллелей этих маркеров в ряду поколений, определить сцепление друг с другом, с известными генами и с анонимными последовательностями ДНК, что широко используется как для картирования геномов, так и для косвенной диагностики наследственных заболеваний. Феномен ДНК-полиморфизма лежит в основе двух распространенных в настоящее время методов идентификации мутантных фрагментов ДНК: анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов и анализа микросателлитных маркеров.

Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ). Присутствие в геноме полиморфных сайтов рестрикции обусловливает вариацию (полиморфизм) длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ). В геноме человека такие полиморфные сайты рестрикции встречаются во всех хромосомах с частотой приблизительно 1 : 300 – 500 п.н.

Этот метод используется для предварительного уточнения локализации мутации при наличии в амплифицированном фрагменте известных сайтов рестрикции и для выявления уже известных точковых замен, меняющих сайт узнавания рестриктаз. Для этого продукты амплификации разрезают соответствующей рестриктазой и на электрофореграмме сравнивают длину изучаемых рестрикционных фрагментов с контролем. При необходимости полученные фрагменты идентифицируют, используя метод блот-гибридизации по Саузерну.

ПДРФ-анализ можно использовать для диагностики гетерозиготного носительства мутаций. При наличии точковых мутаций в гетерозиготном состоянии по данному сайту рестрикции на электрофореграмме будут выявляться три фрагмента: один – исходной длины и два – полученные после рестрикции (рис. 18.7, *а*). При наличии делеций в гетерозиготном состоянии наряду с фрагментами нормальной длины будут присутствовать и необычные по размеру (рис. 18.7, *б*). Выявление полиморфного сайта в гетерозиготном состоянии позволяет отличить мутантный аллель от нормального, т.е. осуществить его молекулярную маркировку. Однако первичная идентификация полиморфного сайта рестрикции, сцепленного с определенным геном, возможна только при наличии соответствующих ДНК-зондов.

ПДРФ-анализ применяют как для прямой (определяют уже известные нуклеотидные замены), так и для косвенной ДНК-диагностики (гл. 19). Косвенная диагностика проводится по полиморфным точкам, расположенным, как правило, в некодирующих областях либо в третьей букве вырожденного кодона, что позволяет различать материнскую и отцовскую хромосомы при семейном анализе в случае гетерозиготности по данному полиморфизму. С другой стороны, такие маркеры являются диаллельными, что приводит к невысокой гетерозиготности по данному локусу особей в популяции (не более 50%), что накладывает существенные ограничения на их использование (в связи с их низкой информативностью).

Анализ мини- и микросателлитных маркеров. В настоящее время хорошо известно, что в некодирующих областях генома присутствуют так называемые тандемные повторы. Эти повторы представляют собой последовательности, состоящие из различного количества мономеров. Мономеры в свою очередь могут содержать от одного и до нескольких десятков нуклеотидов. Эффективность использования мини- и мик-

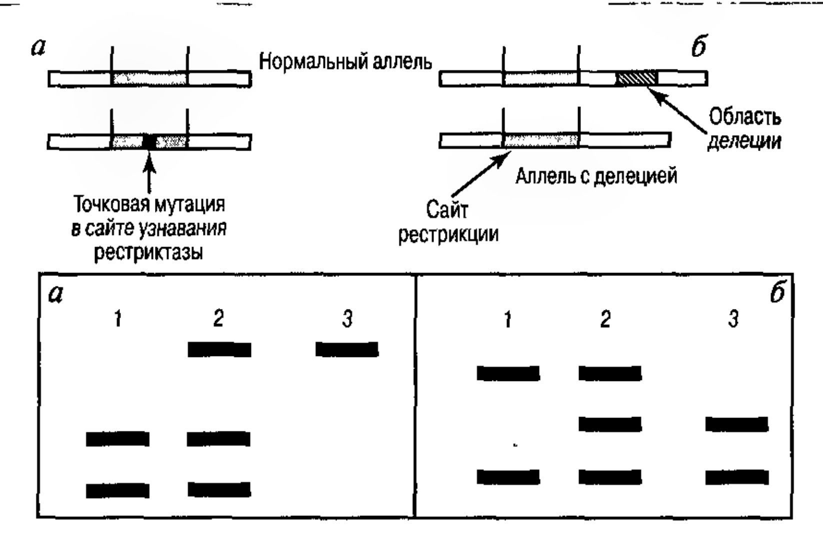


Рис. 18.7. Результаты ПДРФ-анализа при прямой и косвенной ДНК-диагностике

а прямая ДНК-диагностика (нуклеотидная замена в гене расположена в сайте узнавания рестриктазы R): дорожка 1 – гомозигота по нормальному аллелю; дорожка 2 – гетерозигота по нормальному аллелю; дорожка 3 – гомозигота по аллелю с точковой заменой в сайте узнавания рестриктазы R (нуклеотидная замена привела к отсутствию сайту узнавания даны последовательности рестриктазой); б– косвенная ДНК-диагностика делеций (сайт рестрикции фланкирует область делеции):дорожка 1 – нормальная гомозигота; дорожка 2 – делеция в гетерозиготном состоянии (присутствует фрагмент другой длины); дорожка 3 – делеция в гомозиготном состоянии (отсутствует один из фрагментов, имеющихся в норме).

росателлитных последовательностей (маркеров) в ДНК-диагностике обусловлена относительно равномерным распределением их на хромосомах и большим разнообразием. Полиморфизм мини- и микросателлитных повторов настолько высок, что на хромосомах разного происхождения (мать/отец), как правило, эти участки содержат разное количество мономеров, (т.е. отличаются по длине), что позволяет различать хромосомы при семейном анализе, прослеживая их передачу в поколениях, и при идеитификации принадлежности биологического образца (например, пострадавший/подозреваемый). Информативность таких многоаллельных маркеров значительно выше (уровень гетерозиготности достигает 70–90%), чем диаллельных (точковых замен), а характер расположения полос минисателитных ДНК на электрофореграмме («ДНК-отпечаток») индивидуален практически также как и отпечатки пальцев (вероятность идентичности двух индивидов в популяции составляет 10^{5}–10^{8}), что позволило дать название методу – **геномная дактилоскопия** (*genetics fingeprinting*).

«Классический» метод *геномной дактилоскопии* представляет собой гибридизацию по Саузерну (см. 18.1.2.1.) фрагментов ДНК, полученных в результате рестрикции и разделения в агарозном геле. В качестве зондов для гибридизации используется минисателлитная ДНК с длиной мономера от 9 до 40 п.н. и количеством его повтора от 10 до 30. Для установления или опровержения идентичности исследуемых образцов ДНК необходима последовательная гибридизация с 4–5 радиоактив-

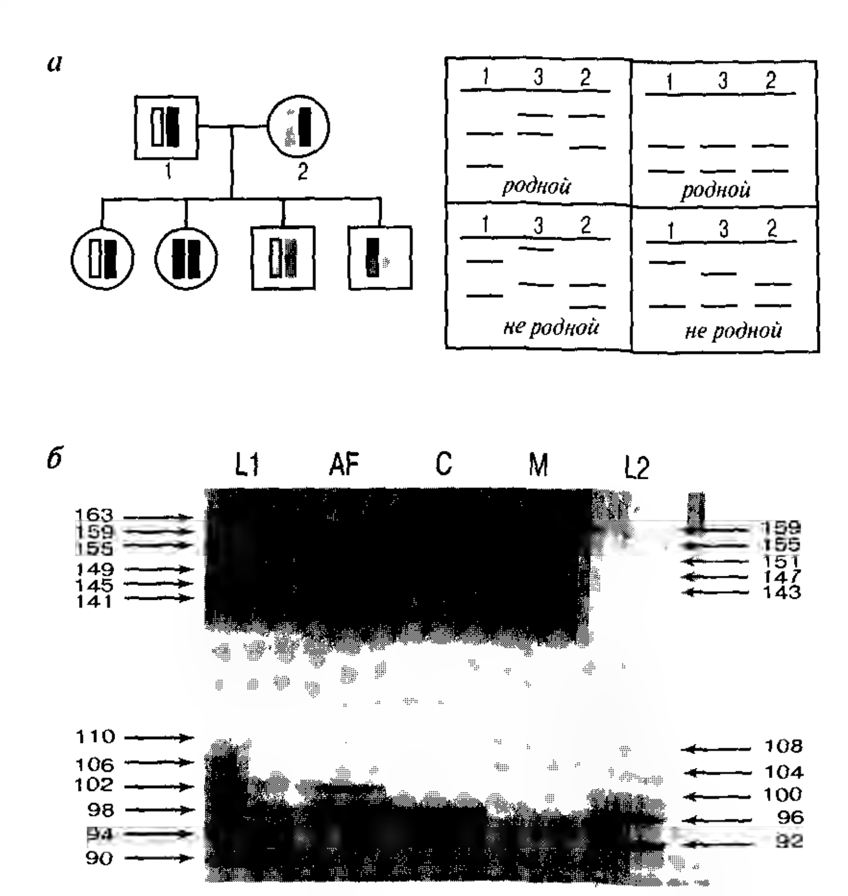


Рис. 18.8. Установление биологического родства путем анализа минисателлитных маркеров (диагностика отцовства)

а – принципиальная схема диагностики кровного родства в семье из трех человек: 1 – предполагаемый отец; 2 – мать; 3 – ребенок; б – фрагмент электрофореграммы результатов ПДРФ-анализа при установлении биологического родства в семье из трех человек по двум STR-маркерам. L1 и L2 – аллельные лэддеры, по которым проводится определение длин фрагментов и, соответственно, числа мономеров в повторе, AF – предполагаемый отец, С – ребенок; М – мать.

но меченными зондами. После каждой гибридизации на радиоавтографе визуализируют и сравнивают между собой наборы различающихся по длине фрагментов, соответствующих минисателлитным последовательностям образцов ДНК. К недостаткам данной методики идентификации биологического материала можно отнести значительную длительность исследования (от нескольких недель до нескольких месяцев) и необходимость достаточно большого количества ДНК.

В последние годы для обнаружения различных мини- и микросателлитиых последовательностей стали использовать различные модификации полимеразной цепной реакции (мультиплексная ПЦР, ПЦР с использованием меченых нуклеотидов). На сегодняшний день наиболее эффективным (т.е. достоверным, не требующим большого количества биологического материала и достаточно быстрым) методом идентификации личности считается сравнительный электрофоретический анализ фрагментов ДНК, полученных в результате мультиплексной ПЦР STR (от англ. *short tandem repeats*)-последовательностей – тримерных и тетрамерных коротких тандемных повторов. Пример установления биологического родства (диагностики отцовства) данным методом представлен на рис. 18.8. Одна половина полос «ДНК-отпечатка» ребенка должна соответствовать таковым у отца, а другая – у матери.

Аналогичные методики используются и для ДНК-диагностики заболеваний. При прямой ДНК-диагностике, например, болезней, обусловленных экспансией тринуклеотидных повторов (STR) в регуляторных или транскрибируемых частях генов, выбор метода анализа количества повторов зависит от их протяженности: при числе повторов менее 200 для генотипирования аллелей используют электрофоретический анализ амплифицированных STR, в случаях больших размеров участка повторов используют метод блот-гибридизации с соответствующими зондами.

Для косвенной диагностики наследственных заболеваний применяют анализ количества микросателлитных (динуклеотидных) повторов. Наиболее часто используют СА-повторы, локализованные в интронах исследуемых генов или в непосредственной близости от кодирующей части гена.

Анализ полиморфизма мини- и микросателлитных последовательностей незаменим и при картировании. Определив генотипы всех членов родословной, можно установить сцепление маркера с геном заболевания.

18.1.3. МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ

Наиболее эффективный способ выявления мутаций – секвенирование кДНК или отдельных экзонов. Довольно часто первичный поиск нарушений в кодирующих областях гена осуществляют именно таким образом. Для генов, имеющих сравнительно небольшие размеры (например, ген фактора IX свертывания крови, детерминирующий гемофилию В), метод прямого секвенирования иногда используют как основной метод сканирования мутаций. Однако, несмотря на наличие методик (различные модификации ПЦР, использование мРНК для получения кДНК), переводящих секвенирование в разряд рутинных методов, секвенирование полноразмерной кДНК (т.е. всех экзонов) для выявления мутаций у отдельных индивидов остается трудоемкой, дорогой и требующей больших затрат времени процедурой. Поэтому на практике полученные путем амплификации или клонирования фрагменты ДНК предварительно тестируют на наличие мутаций более простыми методами, основанными на сравнении физико-химических характеристик мутантных и нормальных последовательностей. Однако точные молекулярные характеристики каждой мутации независимо от ее природы (замены нуклеотидов, делеции, дупликации, инсер-

18.1.3.1. ПЦР-АНАЛИЗ КАК МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИИ

С помощью ПЦР и последующего электрофореза продуктов амплификации в полиакриламидном или агарозном геле обнаруживают мутации, изменяющие длину амплифицированных фрагментов. К таким мутациям относятся делеции и инсерции.

Делеции регистрируют по разнице в размерах и числе амплифицированных фрагментов на электрофореграмме нормального и мутантного образцов ДНК. При отсутствии делеций на электрофореграмме выявляются все амплифицированные фрагменты в виде соответствующих полос.

Небольшие по размеру делеции и инсерции лишь слегка меняют размеры амплифицированных фрагментов ДНК. Именно так была обнаружена в гене муковисцидоза делеция трех нуклеотидов —ΔF508 (гл. 21).

Протяженные делеции в генах, находящихся в состоянии геми- или гомозиготности, выявляют при электрофорезе продуктов мультиплексной амплификации экзонов, наиболее подверженных такой мутации. Если в исследуемом образце ДНК какие-то экзоны делетированы, то на электрофореграмме соответствующие им полосы отсутствуют. Используя перекрывающиеся участки гена для амплификации можно оценить размер делеции и определить ее внутригенную локализацию. Этот метод применяют для выявления делеций в гене дистрофина (гл. 22).

Для обнаружения протяженных делеций, находящихся в гетерозиготном состоянии, используют мультиплексную ПЦР с обязательной количественной оценкой результатов амплификации (**количественная ПЦР**). Этот метод основан на амплификации кДНК, полученной путем обратной транскрипции из эктопической мРНК или из мРНК, изолированной из экспрессирующих данный ген тканей или культур клеток пациента. В качестве олигопраймеров для ПЦР используют последовательности из фланкирующих делецию экзонов гена. При амплификации будут получены лишь фрагменты мутантной молекулы кДНК, небольшие по размеру вследствие близкого расположения граничащих с делецией экзонов. Участок между фланкирующими делецию экзонами в нормальной молекуле кДНК может быть слишком велик для амплификации при выбранных условиях.

На практике проводят мультиплексную ПЦР с использованием набора олигопраймеров, обеспечивающего амплификацию фрагментов, полностью перекрывающих всю молекулу кДНК. Наличие делеции регистрируют по появлению продуктов амплификации необычного размера.

18.1.3.2. ВЫЯВЛЕНИЕ ТОЧКОВЫХ МУТАЦИЙ

Выявление мутаций, представляющих собой замену одного или нескольких нуклеотидов, с помощью ПЦР-анализа невозможно: длина мутантного фрагмента ДНК остается прежней; нарушается лишь конформационная структура, а вместе с ней и некоторые физико-химические свойства молекулы ДНК. Для обнаружения мутаций в виде замен используют анализ конформационного полиморфизма однонитевой ДНК (SSCP) и метод денатурирующего градиентного гель-электрофореза (DGGE). Еще два метода выявления точковых мутаций — гетеродуплексный анализ (HA) и хи-

мическое расщепление некомплементарных сайтов (CMC) – основаны на возникновении структурных нарушений в месте негомологичного спаривания при гибридизации нормальной и мутантной цепей ДНК. Все эти методы анализа амплифицированных продуктов (кроме CMC-метода) для точной идентификации точковых замен в обязательном порядке предполагают секвенирование. Схематическое изображение принципов и методов идентификации точковых мутаций представлено на рис. 18.9.

Анализ конформационного полиморфизма одноцепочечной ДНК (SSCP – от англ. *single strand conformation polymorphism*). SSCP-анализ наиболее часто используемый метод для выявления точковых замен внутри фрагмента ДНК (как правило, размером от 50 до 300 п.н.), полученного в результате ПЦР. Этот метод, предложенный в 1989 году, чрезвычайно эффективен, так как основан на регистрации различий электрофоретической подвижности одноцепочечной ДНК исследуемого и контрольного образцов одинаковых по длине, но различающихся по нуклеотидному составу (см. рис. 18.9, *а*). Различие в нуклеотидной последовательности обусловливает разницу вторичной конформации одноцепочечных фрагментов, образующихся при денатурации (химической или температурной). Именно от вторичной конформации зависит электрофоретическая подвижность молекул ДНК в полиакриламидном геле. На процесс конформации также влияют различные внешние факторы: температура, концентрация акриламида и глицерина в геле, ионная сила буферных растворов.

Эффективность выявления мутаций этим методом существенно зависит от размера анализируемого фрагмента: при его длине менее 200 п.н. она составляет 80 -95%, а при размере более 400 п.н. – около50%.

После обнаружения фрагмента с измененной электрофоретической подвижностью, как правило, проводится секвенирование первичной последовательности ДНК мутантного фрагмента для определения конкретной нуклеотидной замены.

Гетеродуплексный анализ (НА - от англ. *heteroduplex analysis*). Метод НА позволяет идентифицировать мутации, находящиеся в компаунде (мутации в гомологичных генах различные по молекулярной природе и внутригенной локализации) или в гетерозиготном состоянии. Метод основан на выявлении различий электрофоретической подвижности гомодуплексов и гетеродуплексов, полученных при ПЦР (см. рис. 18.9, *б*). При амплификации небольших фрагментов генов гетерозигот и гомозиготных компаундов образуются три типа молекул ДНК: два типа гомодуплексов – из двух нормальных и из двух мутантных цепей, и молекулы, несущие мутацию лишь в одной из цепей (**гетеродуплексы**). Отличие электрофоретической подвижности гетеродуплексных молекул ДНК от обоих типов гомодуплексов обусловлено конформационными особенностями вследствие наличия мест несовпадения нуклеотидов. Вероятность идентификации точковых мутаций методом НА при длине фрагментов ДНК ≤300 п.н. составляет 90–98%.

Денатурирующий градиентный гель-электрофорез (DGGE – от англ. *denaturation gradient gel electrophoresis*). Метод DGGE – основан на различиях в условиях и характере денатурации нормальных и мутантных двухцепочечных фрагментов ДНК, выявляемых путем сравнения их электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле с линейно возрастающим градиентом концентраций денатурирующих агентов (мочевины и формальдегида) (см. рис. 18.9, *в*). Скорость денатурации (или плавления) зависит от соотношения A–T/G–C пар в исследуемых

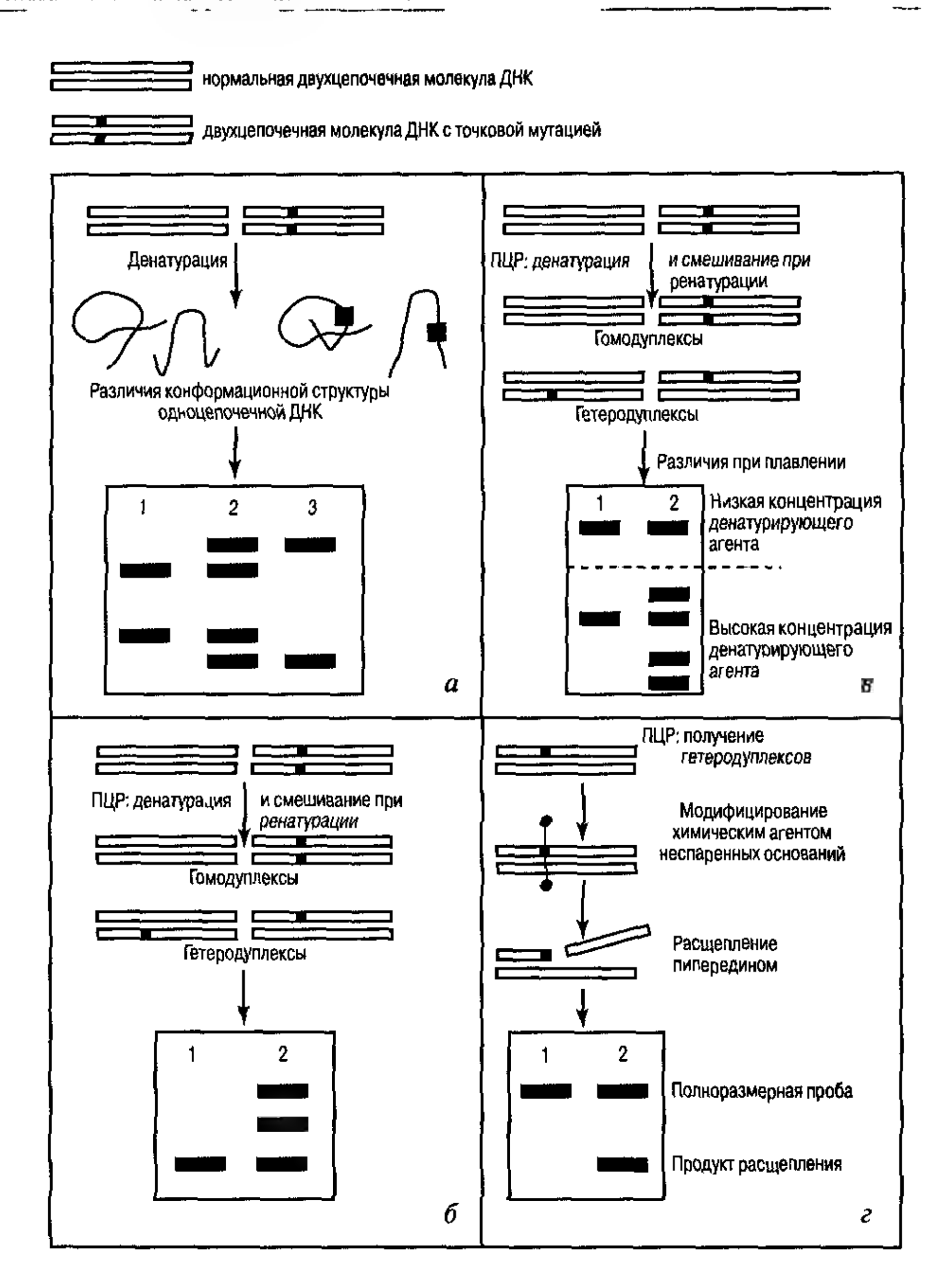


Рис. 18.9. Принципы и результаты идентификации точковых мутаций различными методами (По: В.Н. Горбунова, В.С. Баранов, 1997)

а – SSCP-анализ, *б* – НА-метод; *в* – DGGE-метод; *г*) СМС-метод

Дорожка 1 – образец ДНК нормальной гомозиготы; дорожка 2 – образец ДНК гетерозиготы по точковой мутации; дорожка 3 – образец ДНК гомозиготы по точковой мутации.

фрагментах (G–C-связь более устойчива). При известной нуклеотидной последовательности для подбора условий плавления или определения скорости денатурации при выбранном градиенте концентрации применяют специальную компьютерную программу. Плавление двухцепочечных фрагментов ДНК происходит в строго специфичной для данной последовательности области, эквивалентной температуре плавления (температура, при которой каждая пара оснований с 50%-ой вероятностью может соединиться или разойтись). После начала плавления продвижение двухцепочечного фрагмента ДНК в геле резко замедляется, вследствие изменения пространственной конфигурации молекулы, до момента полной денатурации. Скорость дальнейшего продвижения денатурированных фрагментов ДНК зависит от их нуклеотидного состава.

Для предотвращения денатурации концов молекул ДНК до достижения оптимальной области плавления (обусловлено определенным нуклеотидным составом фрагмента ДНК), к концам молекул ДНК присоединяют так называемые зажимы (синтетические фрагменты из GC-нуклеотидов размером в несколько десятков п.н.). Использование GC-зажимов позволяет выявить все мутации, локализованные вблизи концов амплифицированных участков ДНК, и при длине цепи до 600 п.н. эффективность выявления мутаций методом DGGE достигает 95%.

К достоинствам этого метода, отличающим его от SSCP и HA, следует отнести возможность его использования для анализа крупных амплифицированных фрагментов ДНК и высокую чувствительность (позволяет улавливать точковые мутации, возникшие даже в одной из 100 обработанных мутагеном клеток, что используется при анализе индуцированных мутаций). Чаще всего DGGE применяют для скрининга мутаций в амплифицированных экзонах, при этом в качестве матрицы используют геномную ДНК. К недостаткам метода, ограничивающим его широкое применение в диагностике наследственных заболеваний следует отнести техническую сложность получения равномерного градиента концентрации денатурирующего агента в полиакриламидном геле и высокую стоимость искусственно синтезированных GC-концов.

Химическое расщепление некомплементарных сайтов (CMC – от англ. *chemical mismatch cleavage*). Метод CMC основан на способности ряда химических агентов специфически разрывать цепь ДНК в месте локализации неспаренного основания: например, цитозин чувствителен к действию гидроксиламина, тимин – к действию осмия тетраоксида, а тимин и гуанин – к карбодиимиду. Тестируемые образцы ДНК (или РНК) смешивают с образцом радиоактивномеченного ДНК-зонда и создают условия для образования дуплексов (нагревание с целью полной денатурации и последующее охлаждение). При наличии мутации в тестируемых молекулах образуются гетеродуплексы с участками негомологичного спаривания, что и является мишенью для специфического химического агента. Последующая обработка пиперидином приводит к полному разрыву молекулы ДНК в данной точке и образованию двух коротких фрагментов, обнаруживаемых при электрофорезе (рис. 18.9, *г*) и последующей радиоавтографии. При определении длины каждого фрагмента не составляет труда установить локализацию мутации. Эффективность выявления мутаций методом CMC при использовании радиоактивно меченных ДНК-зондов составляет 95–100%.

Метод СМС пригоден для тестирования протяженных участков ДНК до 2 т. п.н.. Кроме того, с помощью этого метода можно одновременно выявить и локализовать как несколько одинаковых мутаций, так и разных (при использовании нескольких ДНК-зондов – мультиплексный вариант метода) в одном фрагменте ДНК, что можно отнести к огромным преимуществам метода. Основной недостаток метода СМС высокая токсичность используемых химических агентов (карбодиимид менее токсичен).

Методу родственен метод расщепления гетеродуплексов РНКазой А: гетеродуплексы в этом случае образованы тестируемой ДНК и комплементарной ей радиоактивно меченной РНК-пробой, а РНКаза А разрезает молекулу РНК в местах нарушения спаривания оснований. Однако с помощью этого метода можно выявить лишь около 50% точковых мутаций.

18.1.3.3. ДРУГИЕ МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ

Для первичной идентификации мутаций можно использовать и анализ аминокислотной последовательности продукта гена. Этот метод целесообразно применять для выявления редких (не мажорных) мутаций в протяженных генах с большим числом экзонов (ген миопатии Дюшенна, ген нейрофиброматоза I). Метод включает выделение тотальной мРНК из лейкоцитов крови, обратную транскрипцию, амплификацию специфических экзонов кДНК, встраивание амплифицированной области ДНК в экспрессирующую систему и анализ образовавшегося продукта (выявление преципитации с антителами к домену белка).

18.1.3.4. СЕКВЕНИРОВАНИЕ

Секвенирование - последний этап молекулярного анализа предварительно отобранного, клонированного и протестированного более простыми методами фрагмента ДНК. Секвенирование представляет собой определение нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК путем получения серии комплементарных молекул ДНК, различающихся по длине на одно основание.

Существует два основных метода секвенирования: метод Максама-Гилберта (основан на химическом расщеплении ДНК по одному основанию) и метод Сангера (дидезокси-метод). Метод Сангера более надежен и прост в исполнении, и на практике его используют чаще.

Метод Сангера или дидезоксисеквенирование основан на синтезе изучаемой цепи ДНК in vitro с остановкой синтеза на заданном основании путем присоединения дидезоксинуклеотида. Дидезоксинуклеотид лишен гидроксильных групп при атомах сахарного кольца не только в 2′-, но и в 3′-положении, что делает его неспособным формировать фосфодиэфирную связь со следующим нуклеотидом. Такие дидезоксинуклеотиды получают путем синтеза.

Для проведения секвенирования необходимы: секвенирующий праймер (искусственно синтезированная олигонуклеотидная последовательность, комплементар-

ная определенному участку исходной молекулы ДНК), четыре пробирки с набором из четырех дезоксинуклеотидов dATP, dCTP, dGTP и dTTP, один из которых изотопно меченный соответственно добавляемому одному из четырех дидезоксинуклеотидов (ddATP, ddCTP, ddGTP и ddTTP), и ДНК-полимераза.

Сам метод включает следующие этапы: 1) гибридизацию изучаемого фрагмента ДНК с праймером, 2) ферментативный синтез ДНК, 3) денатурацию полученных продуктов формамидом (в результате образуются уникальные различающиеся по длине олигонуклеотидные последовательности, содержащие праймер), 4) электрофорез в полиакриламидном геле на четырех дорожках (по числу типов нуклеотидов) и 5) анализ результатов на радиоавтографе. На большинстве радиоавтографов можно четко различить 250–350 полос, т.е. прочитать последовательность в 250–350 п.н. Нуклеотидная последовательность на радиоавтографе считывается снизу вверх (рис.18.10, *а*). Таким образом, по размеру синтезированных фрагментов может быть определена локализация дидезоксинуклеотидов и порядок соответствующих им нуклеотидов в исходной молекуле ДНК.

Для прочитывания более длинных последовательностей существует ряд методов, представляющих собой разные модификации метода Сангера. Эти методы основаны на предварительном клонировании ДНК в векторах, сконструированных на основе

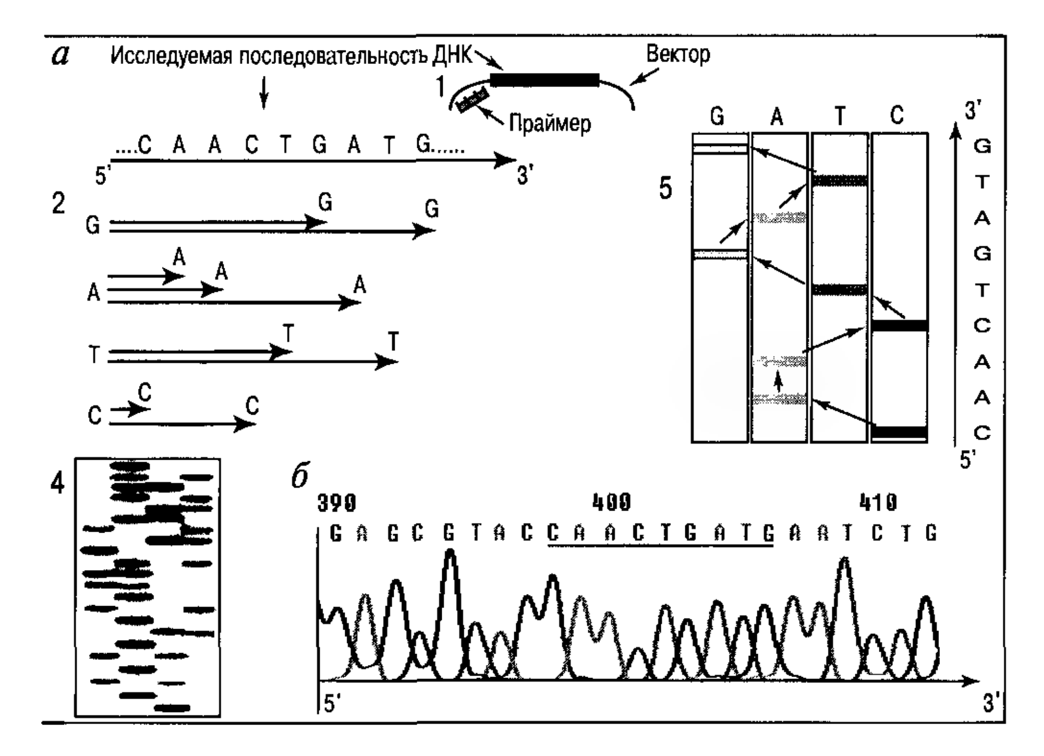


Рис. 18.10. Секвенирование ДНК. (Предоставлено Т.Э. Иващенко)

а – этапы дидезоксисеквенирования по методу Сангера; б – автоматическое дидезоксисеквенирование

фага M13 *E.coli* для получения протяженных одноцепочечных участков ДНК, которые могут быть непосредственно секвенированы без денатурации и праймирования. Особенность фага M13 *E.coli* состоит в возможности его существования в двух формах: двухцепочечной репликативной, функционирующей как плазмида, и одноцепочечной фаговой, использующейся в качестве матрицы для секвенирования. Выделив после клонирования одноцепочечные фаговые ДНК со вставкой (размер около 500 п.н.), праймер гибридизуют с последовательностью вблизи вставки, и проводят дидезоксисеквенирование.

Для секвенирования крупных фрагментов ДНК (около 2000 п.н.) используют более сложные (комбинированные) подходы. Один из них заключается в предварительном клонировании данного фрагмента в плазмидном векторе и построении его подробной рестрикционной карты, идентификации перекрывающихся рестрикционных фрагментов длиной 100–500 п.н. Далее, субклонировав каждый из этих фрагментов в ДНК M13 *E.coli*, их секвенируют и определяют последовательность исходного участка ДНК. Так как субклонированные фрагменты могут быть встроены в противоположных направлениях, то праймер в одном случае будет инициировать синтез первой цепи, а в другом - комплементарной ей, а значит возможно одновременное секвенирование обеих цепей.

Для секвенирования фрагментов ДНК более 5000 п.н. используют методы секвенирования двухцепочечных плазмидных ДНК, не требующие субклонирования. Один из них носит название «*праймер-опосредованной прогулки*» («блуждающей затравки»). Суть метода заключается в последовательном дидезоксисеквенировании по 250–350 п.н. Этапы метода представляют собой цепочку циклов, включающих синтез праймера, дидезоксисеквенирование и идентификацию нуклеотидной последовательности (рис. 18.11): 1) отжиг плазмидной ДНК, содержащей вставку, с праймером, комплементарным последовательности одной из цепей векторной ДНК; дидезоксисеквенирование и идентификация первых 250–350 п.н. вставки; 2) синтез второго праймера, комплементарного сегменту вставки, который отстоит от места связывания первого праймера примерно на 300 п.н., и секвенирование следующих 250–350 п.н., и так далее, пока не секвенируют весь фрагмент. Обязательное условие при секвенировании очень длинных фрагментов иметь праймер длиной не менее 24 нуклеотидов. Это необходимо для того, чтобы избежать спаривания праймера внутри вставки более одного раза. Этим методом были секвенированы фрагменты ДНК, клонированные в бактериофаге λ (≈20 т.п.н.) и космидном векторе (≈40 т.п.н.).

В настоящее время широкое распространение получила методология автоматического ДНК-секвенирования с использованием меченных различными флуорохромами дидезоксинуклеотидов – электрофорез в этом случае проводят на одной дорожке и на электрофореграмме каждому из нуклеотидов соответствует свой цвет полосы, которую сканируют в луче лазера, занося данные в компьютер, который сопоставляет их и идентифицирует, выводя на экран нуклеотидную последовательность (см. рис. 18.10, *б*). Этот метод широко применялся в ходе реализации программы «Геном человека». Использование автоматических секвенаторов снизило стоимость секвенирования одного звена с 1$ до 0,1 $.

Однако существуют еще более быстрые методы автоматического секвенирования. Один из них – секвенирование путем гибридизации исследуемой последовательности ДНК с набором олигонуклеотидов (олигонуклеотидной матрицей), вклю-

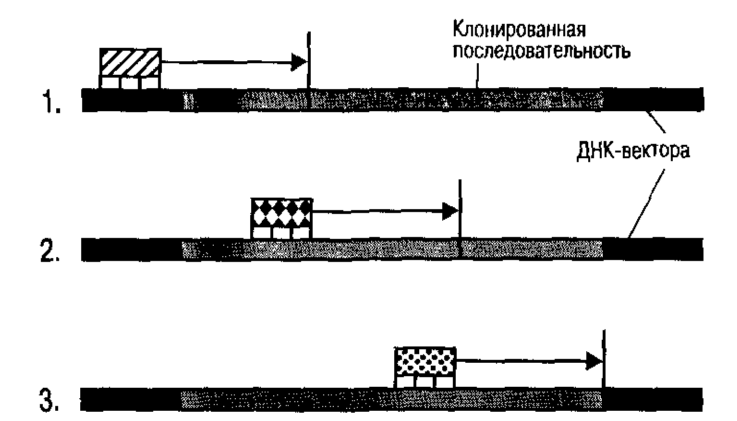


Рис. 18.11. Секвенирование методом праймер-опосредованной прогулки («блуждающей затравки»)

чающим все возможные варианты перестановок из 4 стандартных нуклеотидов (A, G, C, T) определенной длины. Наиболее удобными считаются наборы матриц (**чипы**) из октануклеотидов., при этом количество возможных вариантов нуклеотидов составляет 65536. Секвенируемый фрагмент ДНК, меченный радиоактивным фосфором, гибридизуется только с комплементарными его участкам октануклеотидами.

В результате определяется спектр октануклеотидов, составляющих исследуемый фрагмент ДНК. Локализация октамеров в изучаемом фрагменте ДНК устанавливается при помощи специальной компьютерной программы.

18.1.4. КАРТИРОВАНИЕ И СКРИНИНГ ГЕНОМА

Секвенирование к 2003 г. всего генома человека позволило значительно облегчить процедуру картирования, так как анализируя уже известную нуклеотидную последовательность определенного региона можно более точно и быстро выбрать ген-кандидат для подтверждения его роли в развитии наследственного заболевания. Расшифровка генома позволила упростить и процесс построения физических карт. Однако знания первичной структуры ДНК не достаточно для определения функциональной роли той или иной нуклеотидной последовательности. На повестке дня формирование нового направления программы «Геном человека» – *функциональной геномики*. В связи с этим построение/обновление карт генома не потеряло своей актуальности.

18.1.4.1. КАРТЫ ГЕНОМА И МЕТОДЫ ИХ ПОСТРОЕНИЯ

Карта генома – это схема, определяющая хромосомную принадлежность и взаиморасположение (порядок и расстояние) генов и других компонентов генома. Карты генома можно классифицировать по объему предоставляемой информации (разре-

шающей способности) и методам построения. В зависимости от разрешающей способности выделяют *мелкомасштабные* карты (с низким уровнем разрешения), например, картина дифференциального окрашивания хромосом или генетические карты с расстоянием между соседними маркерами в 7–10 миллионов п.н. (мегабаз – Мб), и *крупномасштабные*, в идеале – полная последовательность нуклеотидов.

По методам построения различают физические и генетические карты (карты сцепления). *Физические карты* целой хромосомы или ее сегмента строятся на основе прямого исследования генетического материала и дают представление о реальном расположении генов в ДНК, расстояние между которыми и фланкирующими их маркерами выражается в п.н., что облегчает их идентификацию и изучение, а также секвенирование. *Генетические карты* показывают линейное расположение маркерных сайтов, расстояние между которыми измеряют в сМ (сантиморган – условная единица частоты рекомбинации; см. гл. 7). Расстояние между локусами равно 1сМ при частоте рекомбнации 1% и соответствует физическому расстоянию приблизительно в 1 Мб (1 млн. п.н.). Частоты рекомбинации, а значит и реальная длина 1сМ, варьируют в различных частях генома, что обусловливает возможность получения лишь ориентировочной информации о физическом (реальном) расстоянии при использовании генетических карт.

Физические карты хромосом и методы их построения. В зависимости от используемого метода можно получить физические карты хромосом с различной степенью разрешения. Соответственно этому выделяют мелкомасштабные физические карты, к которым относятся цитогенетические (хромосомные) и транскрипционные (карты кДНК), и крупномасштабные – макрорестрикционные карты и карты контиг. Физические карты можно построить как для всего генома, так и для изолированной хромосомы. Изолированные хромосомы можно получить путем сортировки хромосом в потоке по размеру (проточная цитометрия), а также из гибридных клеточных линий (гибридные клетки «человек × мышь» при делении теряют преимущественно человеческие хромосомы, в результате чего остается лишь одна хромосома, такую гибридную клетку размножают и поддерживают клеточную линию). При необходимости получения больших количеств определенного фрагмента ДНК при построении крупномасштабных карт используют методы ПЦР и клонирования.

Цитогенетические карты дают информацию о расположении гена на хромосоме относительно ее участков, идентифицируемых методами дифференциального окрашивания. Благодаря такому окрашиванию хромосома в поле зрения микроскопа выглядит «поперечно исчерченной». Расположение окрашенных участков (бэндов) специфично для каждой хромосомы (см. гл. 19). Использование FISH-метода позволяет построить цитогенетические карты с разрешением 2–5 Мб, а его модификации для интерфазных хромосом – 0,1Мб. Таким образом, локализация картированного с помощью FISH-метода гена может быть установлена с точностью до субсегмента и локуса бэнда. Например, согласно принятой цитогенетической номенклатуре ISCN-1995 и номенклатуре используемых в качестве маркеров сегментов ДНК с неизвестной функцией, запись 22q11.2 (D22S75) означает, что ген локализован во 2-ом субсегменте 1-ого сегмента 1-го района длинного плеча хромосомы 22 методом гибридизации in situ в локусе D22S75 (D – ДНК, 22 - № хромосомы, S – уникальный маркер, 75 – № зонда в данном районе хромосомы).

Транскрипционные карты предоставляют информацию о расположении на хромосоме кДНК, что позволяет выявлять гены-кандидаты для тех или иных заболеваний. Искусственно синтезированные с использованием в качестве матрицы мРНК или химическим путем (по известной аминокислотной последовательности) и меченые кДНК-зонды локализуют методом гибридизации in situ. Другой, более перспективный, метод построения транскрипционной карты основан на частичном секвенировании отдельных кДНК-клонов и выявлении специфических маркерных сайтов (*STS – sequence tagged sites*), называемых *экспрессируемыми маркерными сайтами* (eSTS). Для определения хромосомной принадлежности eSTS-сайта проводят ПЦР с ДНК монохромосомных гибридов с использованием eSTS-праймеров. Далее, проводят ПЦР с ДНК клеточных линий гибридных клеток, содержащих только определенные фрагменты конкретной хромосомы человека, и устанавливают локализацию eSTS на хромосоме. Также картирование можно осуществить нанеся eSTS методом гибридизации in situ на карты радиационных гибридов.

Макрорестрикционные карты – дают информацию о взаиморасположении сайтов рестрикции редкощепящих рестриктаз и расстоянии между этими сайтами. Такие карты получают в результате последовательного разрезания ДНК отдельной хромосомы различающимися по сайту узнавания рестриктазами и упорядочения получаемых фрагментов после обработки каждой рестриктазой (собственно физического картирования). При одномоментном использовании нескольких рестриктаз получают фрагменты ДНК, соответствующие по длине расстоянию от концов молекулы ДНК до сайтов рестрикции, и фрагменты, размер которых соответствует расстоянию между сайтами рестрикции. В любом случае для физического картирования исходной молекулы ДНК необходимо знать расположение одного из использованных ПДРФ-сайтов независимо от количества локализованных в этой молекуле сайтов рестрикции. Мечение рестрикционных фрагментов позволяет автоматизировать процесс. Преимущество этого метода состоит в возможности получения полных, без пробелов, карт достаточно больших участков хромосомы. Разрешающая способность такой карты варьирует от 0,1 Мб до 1Мб, что однако ниже чем у карт контиг.

Контиг – это набор упорядоченных перекрывающихся клонов ДНК, охватывающих всю хромосому или какой-либо ее участок. Охватываемый контигом участок измеряется в п.н. До полной расшифровки генома человека контиги служили основой для построения окончательных вариантов физических карт. Контиги были получены на основе YAC-, BAC-, PAC- , P1-, λ- и космидных библиотек ДНК человека.

Для построения контигов из геномных библиотек, содержащих крупные вставки (YAC-, BAC-, PAC-библиотеки), используют метод картирования, основанный на обнаружении в индивидуальных клонах библиотеки различных маркерных сайтов (STS). Таких сайтов (как правило, это короткие тандемные повторы 2–4 нуклеотидов) в геноме человека идентифицировано около 10 000. Зная распределение маркеров в клонах, рассчитывают вероятный набор перекрывающихся клонов и определяют относительное расположение имеющихся маркерных сайтов.

Контиги из небольших фрагментов ДНК, полученные из P1-, λ- и космидных библиотек, более удобны. Наиболее часто для построения контигов используют космидные библиотеки, перекрывающиеся клоны которых идентифицируют методом геномной дактилоскопии. ДНК каждого клона, обработанная рестриктазой, форми-

рует уникальный набор фрагментов, выявляемых на электрофореграмме или радиоавтографическими методами, в зависимости от способа нанесения метки. Для организации контига из анализируемых клонов проводят поиск меченых рестрикционных фрагментов (общих для пары клонов) с помощью компьютерных программ. Наличие перекрывающихся участков в клонах контига подтверждается построением их рестрикционной карты. Пробелы между контигами (поиск недостающих участков) заполняют путем скрининга библиотек из крупных вставок, используя зонды из ближайших концов соседних контигов.

Процесс определения места положения и взаиморасположения генов, кДНК или каких-либо маркеров (сайтов узнавания рестриктазами, STS-маркеров), присутствующих в исследуемой молекуле ДНК, называют *физическим картированием.*

Генетические карты и методы их построения. Построение генетических карт основано на анализе сцепления полиморфных маркеров с хромосомами и сцепления определенных генов с этими маркерами. Оценку сцепления между генами проводят на основании статистического анализа сегрегации признаков в родословной методом максимального правдоподобия, подсчитывая десятичный логарифм шансов (log of the odds), или LOD-балл. Шансы рассчитывают как отношение вероятности наблюдения родословной с наличием сцепления двух генов (частота рекомбинации меньше 0,5) к вероятности наблюдения родословной с отсутствием сцепления этих генов (частота рекомбинации равна 0,5). Гены сцеплены при LOD > +3, и не сцеплены — при LOD < –2. Методика анализа сцепления подробно описана в гл. 19.

Методика построения генетических карт включает: формирование групп сцепления генов, контролирующих различные наследственные признаки; исследование взаимного расположения генов в этих группах и определение соответствия между генетическими группами сцепления и цитогенетически идентифицируемыми фрагментами или целыми хромосомами. Для построения полных карт сцепления необходимо наличие в локусах каждой хромосомы часто встречающихся аллелей (маркеров), принадлежность которых можно идентифицировать. Для картирования генома человека в качестве таких маркеров в основном используют минисателлитные повторы типа STR (от англ. *short tandem repeats*). Карты сцепления хромосом человека постоянно обновляются по мере идентификации дополнительных полиморфных маркеров и локализации признаков. В результате разрешение карты постоянно повышается. К настоящему моменту в геноме человека установлена локализация примерно 6 000 полиморфных ДНК-маркеров, среднее расстояние между которыми ≈1 сМ. На таком участке может локализоваться около 10 генов.

18.1.4.2. СТРАТЕГИИ КАРТИРОВАНИЯ ГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА И МЕТОДЫ ПОЛНОГЕНОМНОГО СКРИНИНГА

Выбор стратегии картирования гена определяется имеющейся информацией о продукте гена и/или о функции гена. Существует две основных стратегии: «*прямая генетика*» — основанная на принципе «от белка к гену», и «*обратная генетика*» — «от гена к белку» и «от нормального гена к мутантному аллелю». Естественно, что первы-

ми были исследованы те гены человека, продукт которых был охарактеризован на уровне белка, а метод картирования, основанный на стратегии «прямой генетики» получил название функционального картирования. В большинстве случаев ни о природе конкретного гена, ни о его продукте, ни о механизме патологии , вызываемой мутацией этого гена, ничего не известно. Это привело к необходимости разработки новых подходов к картированию генов, основными из которых являются *кандидатное, позиционное и позиционно-кандидатное картирование*. Однако независимо от используемого подхода необходимо подтверждение ассоциации гена с данным заболеванием путем обнаружения у больных изменений нуклеотидной последовательности этого гена, отсутствующие у здоровых.

Функциональное картирование используется при известном продукте гена и включает следующие этапы: определение аминокислотной последовательности белка (или выделение мРНК) и реконструкция кДНК; синтез олигонуклеотидного зонда и скрининг кДНК-библиотек для выделения кДНК-клона; установление хромосомной локализации гена-мишени (методом гибридизации in situ или др.); скринирование контигов, охватывающих район локализации гена-мишени, для определения клонов, гибридизующихся с данным кДНК-клоном; секвенирование позитивных клонов и характеристика гена-мишени (выявление мутаций). С использованием этого подхода у человека были картированы гены гемоглобина и факторов свертывания крови.

Кандидатное картирование основано на выборе белка-кандидата, аномалии которого могут привести к симптомам изучаемого наследственного заболевания. Далее выбирают ген(ы)-кандидат(ы), исходя из данных о нуклеотидной последовательности всех клонированных генов, и вырабатывают стратегию поиска мутаций для подтверждения/опровержения ассоциации гена-кандидата и изучаемого заболевания. Данная стратегия не очень эффективна для картирования генов болезней человека, что обусловлено недостатком информации о них. С другой стороны ценность отрицательного результата определяется возможностью исключить данный ген из списка ответственных за данное заболевание. Наиболее успешно этот метод применяется при картировании генов мультифакториальных заболеваний: так были исследованы некоторые гены, продукты которых участвуют в патогенезе сосудистых заболеваний и диабета.

Позиционное картирование (клонирование) – наиболее перспективный метод картирования локусов различных наследственных заболеваний с неизвестным биохимическим дефектом. Этот метод, предложенный в 1980 г., основан на анализе сцепления между геном заболевания и аллелями полиморфных ДНК-маркеров в семьях, что стало возможным лишь при построении подробной генетической карты генома человека. По сути метод является генетическим картированием, но обязателен и последующий скрининг на мутации в генах-кандидатах, лежащих внутри картированной области (позиционных кандидатов). Именно таким способом в настоящее время выявляют гены, ответственные за наследственные заболевания, и изучают генетические механизмы сложных мультифакториальных заболеваний, в том числе и рака. Можно с уверенностью утверждать, что с помощью этого метода при наличии сиквенса всего генома человека будет достигнут значительный прогресс в дальнейших исследованиях по генетике человека, как в норме, так и при патологии.

Методика картирования локуса наследственного заболевания подробно описана в гл. 19. *Метод позиционного картирования лежит в основе классической схемы полногеномного скрининга.*

Применение метода позиционного картирования имеет и свои ограничения. При наличии карт сцепления с разрешающей способностью 1сМ и использовании дополнительных маркеров из области сцепления на практике критический размер области локализации патологического гена составляет 3–5 сМ. Это связано с ограниченным числом мейозов, доступных для анализа. Для регистрации рекомбинаций между повреждением в ДНК, приводящим к заболеванию, и аллелем полиморфного маркера, удаленного на расстояние 1 сМ, в среднем необходимо проанализировать 100 мейозов, а в большинстве работ по картированию анализируется меньшее число. К тому же в интервале 3–5 сМ может находиться от 30 до 50 генов, что значительно затрудняет выявление конкретного гена заболевания. Таким образом, классическая схема полногеномного скрининга позволяет определить локус заболевания, но не обладает разрешающей способностью, достаточной для последующей идентификации патологического гена.

Генетические технологии, обеспечивающие более точную локализацию генов называют **тонким генетическим картированием.** Тонкое генетическое картирование основано на определении **гаплотипов** (сцепленных групп аллелей) в популяциях больных и здоровых индивидов по нескольким полиморфным маркерам, которые наиболее тесно сцеплены с геном, ответственным за заболевание (рис. 18.12). Этот метод эффективен, если среди мутаций, приводящих к заболеванию, имеются одна или несколько частых. Хромосомы, несущие мажорные мутации, в большинстве случаев представляют собой потомки одной мутантной хромосомы – т.е. наблюдается так называемый «эффект основателя». Очевидно, что изначально все потомки хромосомы-основателя имели один и тот же гаплотип, который постепенно размывался в последующих поколениях за счет рекомбинационных событий.

Анализ производных гаплотипа хромосомы-основателя, специфического для данной мутации, позволяет локализовать древние сайты рекомбинаций, которые привели к распаду гаплотипа и, таким образом, уточнить место мутационного повреждения в гене. Параллельно данный подход позволяет определять порядок тесно сцепленных полиморфных маркеров. В отличие от традиционного генетического картирования, где для каждой семьи выявляются рекомбинации, произошедшие в течение нескольких мейозов, при таком подходе анализируются рекомбинации, произошедшие за времена, сравнимые со временем жизни мутации в популяции. Соответственно значительно возрастает и разрешающая способность метода.

Эффективность этого подхода определяется, прежде всего, наличием мажорной мутации и ее возрастом. Если такой мутации не существует, имеет смысл провести аналогичные исследования в других популяциях. Обнаружение неравновесия только в одной популяции может обеспечить успешность проведения тонкого генетического картирования гена, ответственного за возникновение заболевания. На основании анализа неравновесного сцепления можно определить *возраст мутации*. Описанная схема позволяет картировать локус, повреждения в котором приводят к заболеванию, с точностью порядка 0,1 сМ, что соответствует длине последовательности 100–200 т.п.н. В такой достаточно узкой области может быть проведен поиск мутаций во всех расположенных в ней генах.

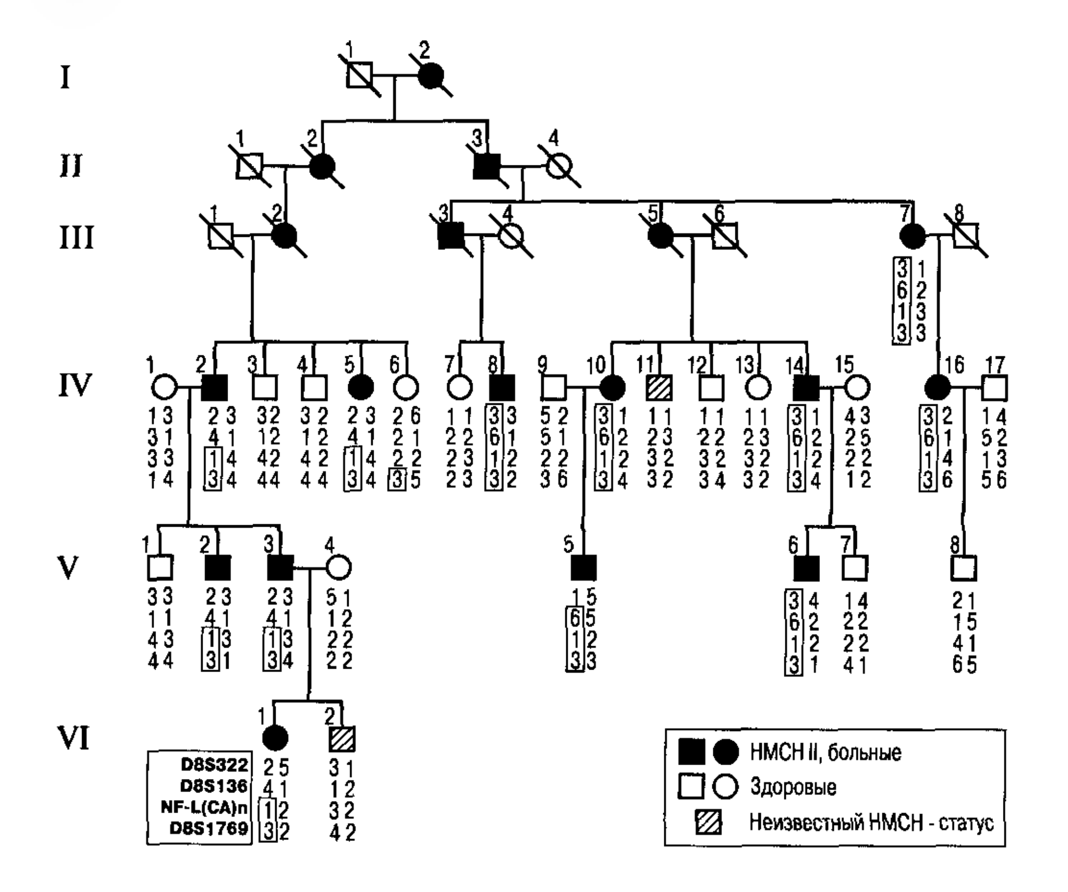


Рис. 18.12. Анализ сегрегации гаплотипов маркеров на 8р21 в семье М. с наследственной моторно-сенсорной нейропатией II типа (НМСН II). (АД-заболевание)

Анализ генотипов в семье М. по трем маркерам (D8S322 (2), D8S1769 (3) и маркеру D8S136, представленному двумя аллелями (4 и 6)) позволил установить минимальную область локализации гена, ответственного за НМСН в данной семье. НМСН II-фенотип сцеплен с одним из аллелей маркера D8S136 (6) в правой ветви родословной, а в левой ветви родословной – с другим аллелем этого маркера (4), следовательно, маркер D8S136 является дистальным (теломерным) фланкирующим маркером для локуса НМСН2Е. Обратная рекомбинация, в результате которой сцепленный с заболеванием аллель маркера D8S1769 (3) присутствует у здорового сибса IV-6, позволила *определить* маркер D8S1769 *как проксимальный* (центромерный) фланкирующий маркер для локуса НМСН2Е. Таким образом, ген НМСН2Е находится между маркерами D8S136 и D8S1769 (интервал 16 сМ).

Успешность применения различных вариантов поиска сцепления зависит от конкретной ситуации. Классический полногеномный скрининг хорошо зарекомендовал себя для анализа больших семей с количеством мейозов, достаточным для установления достоверного сцепления. Этот метод применим и к выборке семей с одинаково четкой клинической картиной заболевания. При исследовании ограниченного числа мейозов или выборок с возможной генетической гетерогенностью заболевания эффективность полногеномного скрининга снижается. Для малого числа мейозов невозможно получить достаточный Lod-балл (больше трех). С другой стороны, высока вероятность получить положительный Lod-балл меньше трех в нескольких независимых точках. Для гетерогенной выборки возможно ложное исключение истинно сцепленного локуса. В этих случаях имеет смысл проводить поиск сцепления с кандидатными локусами, анализируя каждую из имеющихся семей по отдельности. В случае определения сцепленного локуса для эффективного уменьшения области возможной локализации мутации, приводящей к заболеванию, хорошо зарекомендовал себя метод тонкого генетического картирования.

Позиционно-кандидатное картирование основано на выявлении кодирующих последовательностей (кДНК или внутригенных eSTS) в области хромосомной локализации гена с неизвестным биохимическим продуктом путем анализа генетических и транскрипционных карт. Вероятность того, что одна из таких последовательностей окажется геном данного заболевания, достаточно высока. При наличии молекулярных характеристик гена-кандидата проводят его мутационный анализ. В ряде случаев для выделения геномного клона используют «кандидатные» маркеры экспрессирующихся последовательностей (EST — от англ. *expressed sequences tags*) в качестве зондов. Выделенный клон секвенируют и проводят его мутационный анализ. Этот метод очень эффективен при наличии высокоразрешающих физических и транскрипционных карт.

Использование для картирования локусов наследственных заболеваний EST предполагает предварительные исследования по их скринингу. Скрининг ДНК-маркеров, распределенных по геному, может быть оптимизирован, если принять во внимание особенность организации генома, заключающуюся в том, что картированные EST распределяются по хромосомам неравномерно — имеются «богатые» и «бедные» генами участки. На основании этого рекомендуется в первую очередь использовать для картирования микросателлитные маркеры, лежащие в EST-богатых участках хромосом. Разработано два набора таких маркеров: набор А включает 40 маркеров, покрывающих примерно 1/10 генома (принимая, что каждый маркер позволяет анализировать ~10 сМ прилежащей геномной области) и набор В, состоящий из 25 маркеров, который позволяет проанализировать сцепление еще с 2200 EST, лежащими в пределах 10 сМ-интервала от каждого маркера (на каждый маркер из набора В приходится в среднем по 88 картированных EST). Таким образом, исследование 65 маркеров из наборов А и В, покрывающих лишь 17% всего генома, позволяет анализировать сцеплеиие с ~40% всех известных EST. Такой подход сокращает время и стоимость исследования по определению локусов наследственных заболеваний.

18.2. ГЕНОМИКА: НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ, ПЕРСПЕКТИВЫ, НАДЕЖДЫ И ОПАСЕНИЯ

Комплексное изучение структуры и функции генома привело к формированию самостоятельной научной дисциплины, названной **«геномикой»**. Предмет этой науки – строение геномов человека и других живых существ (растений, животных, микроорганизмов и др.), задача – применить полученные знания для улучшения качества жизни человека. В рамках этой новой научной дисциплины проводятся исследования по *функциональной геномике, сравнительной геномике, а также по генетическому разнообразию человека.*

Бурное развитие молекулярной биологии и генетики во второй половине XX века, появление технологий рекомбинантных ДНК дали в руки исследователей мощный инструмент для изучения молекулярных механизмов болезней, для разработки новых молекулярных методов диагностики, терапии и профилактики различных заболеваний. Итогом и продолжением развития этих исследований явился проект «Геном человека». Как следует из названия этого проекта его цель заключалась в секвенировании всего человеческого генома. Расшифровка генома, состоящего из 3×10^9 п.н. и содержащего 20–28 тыс. генов, завершена в 2003 г., о чем было объявлено 17.04.2003 г. Международным консорциумом по секвенированию генома человека. Знание полной нуклеотидной последовательности генома человека позволит создавать более точные генетические карты и, кроме того, ускорит идентификацию генов, которые были локализованы путем анализа сцепления с конкретным маркером. К 2001 г. было идентифицировано 1,42 миллиона случаев полиморфизма по отдельным нуклеотидам (*single nucleotide polymorphisms, SNPs*). SNP-маркеры встречаются с частотой 1 на 500 оснований; опубликована их карта. При изучении генетической восприимчивости к заболеваниям наиболее перспективно использовать внутригенные SNP, число которых в настоящее время составляет 60 000. Важно, что маркеры встречаются именно в гаплотипах, различающихся между индивидами, и, возможно, разработка карт гаплотипов окажется более перспективным подходом к идентификации генов. Значительная вариабельность по разным видам ДНК-маркеров, отражающая степень изменчивости геномов, предоставляет большие возможности для изучения эволюционной истории разных видов организмов.

Важнейший элемент геномных исследований - характеристика различных генов, составляющих эти геномы, изучение механизмов их регуляции, взаимодействия друг с другом и с факторами среды в норме и при патологии. Охарактеризовать таким образом как можно большее количество генов - основная задача **функциональной геномики**. Чтобы ответить на вопрос, как функционируют и как регулируются примерно 25 000 генов, составляющих геном человека, необходимы длительные мультидисциплинарные исследоввания.

Как говорилось выше, анализ любого генома включает определение нуклеотидной последовательности, белковых продуктов генов, изучение взаимодействия разных генов и белков и механизма регуляции всей системы. После расшифровки генома усилия исследователей фокусируются на изучении белковых продуктов генов.

Этим занимается **протеомика**. Ее задача – определить все белки, синтезируемые в клетке, выяснить их строение, количество, локализацию, модификацию и механизмы взаимодействия.

Еще одно важное направление функциональной геномики – **транскриптомика** – изучает координированную работу генов, образование первичных транскриптов, процессы сплайсинга и формирования зрелых мРНК. Благодаря технологии микрочипов удается одновременно анализировать картину транскрипции мРНК со ста тысяч генов. Исследование «транскриптома» этим методом позволяет установить различия между экспрессией генов в разных тканях, проанализировать характер экспрессии в разные периоды болезни, а также классифицировать белки – на секретируемые и связанные с мембранами (определяя положение их мРНК).

В рамках еще одного направления функциональной геномики – **цитомики** – исследуют генетические механизмы и генетический контроль клеточной дифференцировки и гистогенеза, а также образования субклеточных структур.

Технологии, позволяющие анализировать молекулярные механизмы путем сравнения генов или их продуктов в разных органах и тканях, а также геномов различных организмов, развиваются в рамках **сравнительной геномики**. Так, сравнения белковых последовательностей внутри и между видами организмов помогают получить информацию об их потенциальных функциях. Однако при неудаче простого сравнительного анализа, основанного на гомологии с другими белками и/или на их трехмерном строении, определяют разные компоненты белковых комплексов и/или клеточных структур перед тем, как их истинная функция станет очевидной. Изучение координации внутри клетки и организма действия пакетов генов путем сравнения геномов разных видов основано на том, что жизненно важные регуляторные функции сохранились у многих видов организмов на протяжении эволюции. Например, информация о регуляции клеточного цикла, необходимая для понимания процесса канцерогенеза у человека, была получена путем сравнения с аналогичными процессами у дрожжей. Избирательная инактивация у мышей позволила определить функции многих эффекторов иммунной системы и регуляторов ранних стадий кроветворения.

Параллельно с программой «Геном человека» шла работа по секвенированию геномов организмов, имеющих значение для здоровья и жизнеобеспечения человека. Такая информация необходима, чтобы наиболее эффективно использовать знания, полученные при разработке проекта «Геном человека» .

Наибольший успех достигнут в секвенировании геномов патогенных для человека организмов и переносчиков заболеваний, что имеет непосредственное приложение к профилактике, диагностике и лечению инфекционных и трансмиссивных заболеваний. Уже секвенировано или частично секвенировано более 30 геномов важных бактерий и паразитов, среди которых *Haemophilus influenzae, Saccharomyces cerevisae, Mycobacterium tuberculosis, Campylobacter jejuni, Escherichia coli, Vibrio cholerae, Mycobacterium leprae, Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, Yersinia pestis, Salmonella tiphimurium*. В ближайшие 2–4 года ожидается завершение проектов по секвенированию более 100 других видов, среди которых *Plasmodium falciparum, Leishmania, Tripanosoma brucei, Tripanosoma cruzi, Aspergillus fumigatus, Bacillus anthra*. Секвенированы практически все геномы вирусов и почти все белок-кодирующ

районы геномов прокариот. Расшифровка вирусных геномов, знание механизмов инфицирования, репликации и формирования новых вирусных частиц, позволяют проектировать новые антивирусные лекарственные препараты, которые разрушают вирусный геном, мешая синтезу белков или блокируя передачу вируса из клетки в клетку. Широкое использование ПЦР для идентификации организмов, трудно выращиваемых в культуре, неоценимо для диагностики и контроля инфекционных заболеваний. Например, ПЦР-метод позволяет отслеживать и оценивать активность инфекционного процесса до и по ходу лечения при вирусном гепатите С. С помощью микрочипов можно изучать экспрессию различных наборов генов у микробов и паразитов на разных фазах инфекции, анализировать механизмы вирулентности и устойчивости патогенов к защитным механизмам хозяина и лекарственным средствам. Информация о характере генной экспрессии на разных стадиях клеточного цикла у патогенных микроорганизмов, обнаружение генов их вирулентности позволяет выявить новые точки возможного приложения лекарственной терапии. С помощью этого подхода, а также данных по секвенированию генома *Plasmodium falciparum*, удалось выявить блокатор ключевого для *Plasmodium falciparum*, метаболического пути, называемого DOXP. Данный путь характерен для всех растений и бактерий, но отсутствует у человека. Блокатор DOXP-пути – препарат фосмидомицин – эффективен против полирезистентных к хининовым препаратам штаммов плазмодия и является родоначальником нового класса антималярийных лекарственных средств.

Секвенирование геномов патогенных организмов предоставляет информацию и о новых генах с неизвестной функцией, которые могут быть использованы для разработки не только новых классов диагностикумов и лекарственных средств, но и вакцин. Так, при секвенировании генома вирулентного штамма *Neisseria meningitidis* группы В, приводящего к гнойному менингиту, было определено свыше 500 поверхностно-экспрессирующихся или секретирующихся белков (поверхностных антигенов). Соответствующие им последовательности ДНК были клонированы и экспрессированы в бактериях, а продукты экспрессии, предположительно являющиеся значимыми поверхностными антигенами, использованы для иммунизации мышей. В результате появились две высоко устойчивые вакцины-кандидаты. В настоящее время вакцины против *Neisseria meningitidis* групп А и С, широко используются в практике и присутствуют в календаре прививок. Продолжаются испытания на модельных объектах, в частности на мышах, кандидатных противотуберкулезных вакцин, одна из которых представляет собой фрагмент ДНК, кодирующий белок теплового шока *M. tuberculosis* (генная иммунизация). Эта вакцина не только защищает здоровых мышей от болезни, но и лечит уже инфицированных. Предварительное клиническое тестирование проходят и другие вакцины, основанные на ДНК: среди них вакцины для профилактики малярии. В настоящее время у животных проводится генная иммунизация для выработки иммунитета к некоторым вирусным патогенам (ВИЧ, вирусы гепатита, герпеса, бешенства) и малярийному плазмодию.

Определение полной нуклеотидной последовательности ДНК комара *Anopheles gambiae*, (переносчика малярии) позволит выявить различия в геномах комаров, связанные со способностью к передаче заболевания. Полученную информацию можно использовать для «конструирования» с помощью транспозонов таких особей, у кото-

рых эта способность снижена. Внедрение трансгенных комаров в природную экосистему приведет к снижению заболеваемости малярией.

Различия индивидуальных ответов организма хозяина на инфекционный агент, детерминированы генетически. Необходимо идентифицировать семейства генов, участвующих в модификации восприимчивости к заболеваниям. Например, в случае малярии это гены серповидноклеточности и наследственного овалоцитоза, что следует учитывать при оценке эффективности противомалярийной вакцины. Обнаружение мутаций, изменяющих структуру хемокинового рецептора (он участвует в проникновении ВИЧ в клетку) и проявляющихся выраженной резистентностью к СПИДу, послужило толчком к разработке нового подхода к терапии этого заболевания – создания аналога хемокинового рецептора, препятствующего проникновению вируса в клетки. Можно надеяться, что полученные знания о тонких механизмах организма против инфекционных агентов помогут нам в поиске наиболее логичных путей лечения большинства инфекционных болезней.

Анализируя вместе данные о структуре геномов патогенных организмов, геномов переносчиков заболеваний, а также генома человека, можно выявлять причины индивидуальных различий в восприимчивости к ряду заболеваний в человеческих популяциях. Такие исследования позволят более эффективно использовать информацию о распространении инфекционных заболеваний внутри тех или иных популяций и прогнозировать эпидемиологическую обстановку в отношении «новых» опасных инфекций, например, одного из вариантов болезни Крейтцфельда–Якоба, фатальной инсомнии, новых штаммов вируса гриппа, хантавирусов. Это обеспечит своевременную разработку новейших подходов к профилактике этих заболеваний.

Ценная информация может быть получена при расшифровке геномов таких хорошо изученных биохимически и генетически модельных организмов, как нематода *Caenorhabditis elegans*, плодовая мушка *Drosophila melanogaster* и дрожжи *Saccharomyces cerevisae.*

Известно, например, что процессы старения могут быть связаны с ослаблением механизмов защиты от вредных воздействий эндогенных и экзогенных оксидантов на ДНК и белки. Такая физиологическая система может быть чрезвычайно консервативной и присутствовать у эволюционно далеких видов. И действительно, у дрозофилы обнаружена копия аллельного варианта гена нематоды (*daf2*), участвующего в процессе старения.

Простота генома рыбки *Danio* также открывает хорошие перспективы для идентификации и изучения функций генов, которые сохранились на протяжении эволюции. Для идентификации кодирующих последовательностей и регуляторных районов в геноме человека и патогенных организмов наибольшее значение играет изучение генома мыши. Это связано с наличием у мыши и человека больших сегментов хромосом, имеющих одинаковый порядок расположения генов (**синтения**). К тому же ряд болезней мыши сходны с таковыми у человека. Используя методику эмбриональных стволовых клеток, можно «нокаутировать» гены по одному и исследовать их функции, а также воспроизводить не существующие в природе у мыши аналоги заболеваний человека. Изучение вариаций клинического фенотипа моногенных болезней иа мышах, подвергнутых аутбридингу, позволяет выявлять гены, меняющие течение таких заболеваний, и находить аналогичные гены-модификаторы у челове-

ка. Таким образом, мыши служат хорошей моделью при расшифровке молекулярных механизмов патогенеза как моногенных, так и сложных мультифакториальных заболеваний. Чрезвычайно полезны они и при испытании новых лекарственных средств.

Проекты по картированию и секвенированию геномов растений направлены на выявление генов, контролирующих рост, плодовитость, устойчивость к патогенам, а также на «конструирование» трансгенных растений с необычными свойствами, например: картофеля, вырабатывающего токсичный для колорадского жука белок; риса, продуцирующего провитамин А, необходимый для профилактики заболеваний глаз и инфекций, и других. На основе генетически модифицированного картофеля получена и испытана рекомбинантная вакцина против гепатита В (поверхностный антиген). Разрабатываются подобные съедобные вакцины против холеры, кори и вируса папилломы человека, участвующего в развитии рака шейки матки. Информация о геноме высокоурожайных и устойчивых к неблагоприятному воздействию среды растений используется не только в генной инженерии, она чрезвычайно важна для анализа геномов у других организмов. Например, анализ взаимодействия разных генов у растений, в результате которого меняется их фенотип (скажем, рост и устойчивость к болезням у томатов), указывает направление поиска похожих механизмов, действующих у животных и человека. Методики, применяемые для переноса генов у растений, выяснение их достоинств и недостатков, позволяют избежать ошибок при использовании аналогичных подходов в генной терапии человека.

Достижения функциональной геномики уже сейчас находят применение в медицинской практике. За последние 20 лет идентифицировано около 1700 генов, мутации в которых приводят к моногенным болезням, выявлено ≈100 генов, обусловливающих различные формы рака. Установлено, что моногенные болезни характеризуются значительным клиническим полиморфизмом даже внутри семей с одинаковой мутацией. Тяжесть клинической картины определяется присутствием в генотипе различных модифицирующих генов, действие которых часто отсрочено. Средовые факторы также могут изменять фенотип. Эти данные используются для определения носительства мутаций, популяционного скрининга, пренатальной диагностики.

Молекулярнобиологический подход оказался полезным и при изучении канцерогенеза. Данные о механизмах трансформации протоонкогенов и генов-супрессоров опухолевого роста позволили классифицировать определенные опухоли по характеру экспрессии различных наборов генов, а благодаря технологии микрочипов удалось показать, что разные варианты генной экспрессии определяют различный прогноз. Этот факт дает возможность сделать терапию рака более функционально направленной. Например, при формах рака, сопровождающихся низкой активностью тирозинкиназы, вместо радио- и химиотерапии, уничтожающих и злокачественные и здоровые клетки, можно назначать больным тирозинкиназу, действующую только на клетки опухоли. ДНК-диагностика помогает выявлять носителей мутаций и проводить своевременное профилактическое лечение пораженных индивидов. Например, диспансеризация и своевременное хирургическое лечение носителей гена семейного аденоматозного полипоза могут предотвратить развитие у них рака толстой кишки. Исследования по ДНК-диагностике и терапии рака по су-

ти дела только начались, но, возможно, что со временем они послужат основой для разработки программ популяционного скрининга рака.

Для исследования генов мультигенных систем, обусловливающих развитие мультифакториальных заболеваний, в основном применяется два подхода: изучение кандидатных генов и анализ сцепления. Однако в ряде случаев при изучении этой группы патологии необходимо сравнение полных геномов. Использование полногеномного скрининга позволило идентифицировать ген предрасположенности к диабету второго типа, продукт которого является представителем кальпаинподобного цистеинового семейства протеаз. Этот результат может свидетельствовать о существовании до сих пор не описанного пути регуляции метаболизма глюкозы и, следовательно, о недостаточности наших знаний о биохимических процессах, происходящих в организме, и непонимании механизмов развития мультифакториальных заболеваний.

Индивидуальная вариабельность ответа на прием лекарственных препаратов послужила основой для развития нового направления исследований – **фармакогеномики**. Эта область геномики изучает вклад генетической компоненты в токсичность и эффективность лекарственного препарата для данного организма. Было обнаружено, например, что у людей, страдающих недостаточностью глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, в ответ на противомалярийные и другие оксиданты возникает тяжелая гемолитическая анемия. Эффективность и токсичность противотуберкулезного препарата изониазида обусловлены скоростью инактивации этого лекарства у конкретного больного. Такие исследования создают предпосылки для подбора лекарственного препарата и его дозы строго индивидуально, в соответствии с данными ДНК-типирования и биохимичесими особенностями каждого пациента. В популяциях с высокой частотой побочных эффектов на лекарственный препарат, используемый для лечения распространенного заболевания, генетический скрининг проводить особенно важно. Идентификация генов резистентности к лекарственным препаратам у патогенных организмов позволяет скринировать их популяции с помощью ДНК-технологии. Подобные эпидемиологические исследования необходимы для повышения эффективности терапии инфекционных заболеваний в каждой конкретной популяции.

Данные функциональной геномики должны учитываться не только в терапии широко распространенных заболеваний, на их основе разрабатываются новые методы лечения моногеных заболеваний. К таким методам можно отнести генную терапию и терапию стволовыми клетками (гл. 26).

Несмотря на колоссальные возможности геномных технологий для профилактики, диагностики и лечения заболеваний, не следует пренебрегать традиционными подходами и методами клинической медицины. Более того, стремительное развитие геномики привело к постановке ряда вопросов о целесообразности, экономической эффективности, безопасности и доступности использования ряда ее результатов, а использование геномных технологий породило ряд биоэтических, социальных и правовых проблем.

18.2.1. БИОЭТИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ГЕНОМИКИ

В XX веке к традиционным методам и средствам медицинского вмешательства добавились новые, в том числе, генетические. На протяжении 100 лет своего развития генетика человека и медицинская генетика поступательно продвигались по пути: 1) выявления наследственной природы отдельных признаков и недугов человека, 2) демонстрации приложимости к человеку правил Менделя и хромосомной теории наследственности, 3) разработки базовых генетико-статистических методов прогноза здоровья в семьях.

В настоящее время известно, что носителем генетической информации, передающейся от родителей к детям, служит ДНК хромосом клеточных ядер, составляющая его геном.

Одна из основных функций ДНК – кодирование генетических текстов (генов), определяющих время, место и интенсивность синтеза каждого белка в организме. В строении генов и хромосом изредка возникают нарушения. Их масштаб варьирует от перемещений, замены, добавления или утраты единичных нуклеотидов до заметных под микроскопом аномалий отдельных хромосом и даже всего хромосомного набора. Нарушения в строении ДНК и хромосом часто приводят к патологии, вызывая генные и хромосомные болезни или способствуя развитию разнообразных хронических заболеваний и пороков развития человека.

Обилие новых данных о тонком строении генома человека, полученных в рамках одноименной международной программы, породило целый ряд прикладных разработок, ориентированных на решение основных задач медицины – диагностику, лечение и профилактику заболеваний человека. Тонкие методы выделения, фрагментации, полимеризации, картирования и гибридизации ДНК уже вошли в лабораторную и клиническую практику. Причем, в диагностике разных форм патологии прогрессивно возрастает значение геномных технологий.

Современные молекулярнобиологические методы позволяют расщеплять хромосомную ДНК человека на относительно короткие отрезки, доступные для полной расшифровки. Благодаря этому появилась возможность выявлять и картировать на хромосомах избыточные, недостающие или измененные последовательности ДНК. К настоящему времени обнаружено и изучено несколько сотен патологически измененных последовательностей ДНК, обусловливающих развитие различных заболеваний. Практически это означает возможность точного диагноза и прогноза заболеваний, поскольку изменения в геноме присутствуют и передаются от клетки к клетке не только во время уже разыгравшейся болезни, а постоянно, во всех клетках тела с самого начала эмбрионального развития. В последние годы активно разрабатываются методы генно-инженерного конструирования средств переноса корригирующих ДНК-последовательностей. Существование таких средств «доставки» делает молекулярную заместительную терапию генетических дефектов реальностью.

Сходное с генетикой положение имеет место и в других разделах биомедицины – репродукции человека, трансплантации клеток, тканей и органов и т.д. Все нарастающее проникновение в медицину различных биотехнологий привело к вычленению из общей и медицинской этики специального раздела – **биоэтики**, имеющей уже 20-летнюю международную историю.

При ближайшем рассмотрении совокупность этических (биоэтических) норм поведения человека складывается из трех составляющих: врожденной, доктринальной и кон-

венциональной этики. Правила *врожденной этики* устанавливаются обычно как инстинктивное поведение человека, им не обучают сознательно, с ними появляются на свет.

Доктринальная этика – это, прежде всего, этика религиозная или базирующаяся на какой-либо иной идеологической доктрине и присутствующая во всех человеческих сообществах, начиная с самых древних.

Наконец, есть *этика конвенциональная*, которая устанавливается по взаимной договоренности людей или человеческих общностей: взаимосогласованные правила поведения по отношению друг к другу.

Соблюдение норм этики особенно важно в эру высоких гено-, био- и иных технологий, инвазивных по отношению к человеку, и не только к его соматическому статусу, но и к его интеллектуальной, эмоциональной, духовной сфере (что тоже бывает) и даже к его потомству.

Ввиду того, что мир населен многими народами с разными религиозными и идеологическими воззрениями, нормы биоэтики варьируют. Так, в одном международном обследовании по биоэтике, которое было организовано Национальным институтом здоровья США и в котором участвовали исследователи из 39 стран (в том числе, и группа из России), выявилось, что есть некоторые частные этические понятия, действие которых ограничено какой-либо одной общностью людей, например, одной нацией, одним этносом или адептами определенной веры. Вместе с тем, есть нормы этики общепринятые на более высоком наднациональном, региональном уровне. Наконец, существуют еще и некоторые этические элементы глобальной значимости. Все эти аспекты в настоящее время широко обсуждаются международным сообществом.

В *глобальной биоэтике* есть некоторые ключевые понятия или постулаты. Четыре из них можно назвать наиболее важными: 1) «автономия личности» – право человека самому решать все вопросы, которые касаются его тела, психики, эмоционального статуса; 2) «справедливость», которая подразумевает равный доступ всех людей к общественным благам; это касается и медицинского обслуживания; 3) гиппократовское «не вреди», означающее, что этично применять к какому-либо лицу лишь те воздействия, которые не причинят ему вреда и 4) «не только не вреди, но и сотвори благо». Эти четыре принципа рассматриваются как центральные на всех уровнях биоэтики и во всех ее разделах и аспектах во всем мире.

Широкое клиническое применение генодиагностики и генетического скрининга привело к накоплению образцов ДНК в специализированных «банках». Использование этих образцов для исследовательских и диагностических целей требует регламентации. Разработку нормативных документов в этой сфере осуществляет этический комитет Всемирной Организации Здравоохранения. Информация о ДНК важна не только для самого индивида, но и для его родственников, поэтому в первую очередь должен быть решен вопрос о доступности для них хранящихся образцов.

Супруг донора может быть проинформирован о факте помещения ДНК в банк, но не должен получать информацию о ней без согласия донора. Работодатели, страховщики, работники образования и др. третьи стороны не должны иметь доступа к хранящейся информации. При проведении научных исследований образцы в обезличенном виде могут быть предоставлены банком ДНК с согласия донора. Следует иметь в виду, однако, что использование обезличенных образцов исключает возможность применения полезных для данного донора результатов научного исследования

для блага его собственного здоровья и здоровья членов его семьи. Для регламентации работы банков ДНК представляется наиболее правильным получение письменного информированного согласия донора ДНК на предоставление его образца для научных исследований. Согласие может также включать разрешение на предоставление образца родственникам или супругам.

Этические проблемы исследования генома человека и практического использования геномных технологий находятся в центре внимания ВОЗ, Международных комитетов по биоэтике при Совете Европы и ЮНЕСКО. Названными организациями уже разработаны основные документы по рассматриваемой проблематике.

ЮНЕСКО в 1997 г. единогласно принята «Всеобщая декларация о геноме человека и о правах человека», которая стала первым всеобщим правовым актом в области биологии, гарантирующим соблюдение прав и основных свобод и учитывающим необходимость обеспечения свободы исследований. Свобода проведения научных исследований является составной частью свободы мысли. Цель прикладных исследований генома человека – уменьшение страданий людей и улучшение состояния здоровья каждого человека и всего человечества. Ученые, а также лица, принимающие политические решения в области науки, обязаны учитывать этические и социальные последствия исследований генома человека.

Этими проблемами занимается и Совет Европы, который принял в 1996 г. «Конвенцию о правах человека и биомедицине». В ней уже нашли отражение особенно близкие к генетике и геномике проблемы. Сейчас этот документ конкретизируется и детализируется. Четыре группы экспертов: по генетике человека, по эмбриологии, по репродукции и по социальным аспектам здравоохранения готовят дополнительные протоколы к принятой конвенции, которые должны быть предложены на утверждение Европейскому парламенту.

В России существуют Основы законодательства по охране здоровья, в которых изложены правила поведения врача по отношению к пациенту. Правда, специфика поведения врача с больными наследственными болезнями, там никак не обозначена. Имеется Федеральный закон о генно-инженерной деятельности. Есть проект закона «О правовых основах биоэтики и гарантиях ее обеспечения». Это один из законопроектов, вызвавших у общественности оживленные дебаты, так как оказалось, что разброс мнений относительно биоэтики в нашем обществе очень велик.

Большое значение для общества имеет взгляд на биоэтические проблемы Русской Православной церкви. В ряде документов даны взвешенные оценки основным направлениям прикладной геномики и репродуктивной медицины и их совместимости с Православием.

Представляется, что правовая и этическая регламентация медицинских приложений генотехнологий в России должна строиться с учетом и международного опыта, причем для решения возникающих проблем требуются совместные усилия медиков, генетиков, юристов, философов, социальных работников и богословов. Однако существующая система образования мало способствует их взаимопониманию. Особое значение имеет и повышение информированности всего общества и отдельных его групп в вопросах генетики и использования современных генетических технологий. Важно, чтобы люди не испытывали излишних страхов перед достижениями генетики, и в то же время не имели завышенных ожиданий.

ЛИТЕРАТУРА

Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. В 3-х т. Перевод с англ. М.: Мир 1987.

Албертс Б., Брей Д., Дж. Льюис, Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. 2-е изд. В 3-х т. Перевод с англ. М.: Мир, 1994. Т. 1. Гл. 7.

Астауров Б.Л. Наследственность и развитие. М.: Наука, 1974. С. 54–109.

Ауэрбах Ш. Проблемы мутагенеза. Перевод с англ. М.: Мир, 1978. 463 с.

Башкиров В.Н. Происхождение гетерохроматина у эукариот//Генетика. 2002. Т. 38. № 6. С. 789–792.

Билева Д.С., Морозов Н.Н. Генетика. Методическое пособие для студентов. М.: РГМУ, 1999. 181 с.

Билева Д.С., Зимина Л.Н., Малиновский А.А. Влияние генотипа и среды на длительность жизни *Drosophila melanogaster*//Генетика, 1978. Т. 14. № 5. С. 848–852.

Богданов Ю.Ф. Гомологические ряды изменчивости признаков мейоза: эволюция и консерватизм//Материалы конференции памяти Н.Н. Воронцова. Издат. Отдел УНЦ ДО, 2001. С. 60–75.

Бочков Н.П. Клиническая генетика. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. 448 с.

Бочков Н.П., Чеботарев А.Н. Наследственность человека и мутагены внешней среды. М.: Медицина, 1989. 270 с.

Герасимова Т.И. Биохимические мутации и структура генетических локусов у дрозофилы. Сб. Биохимическая генетика дрозофилы. М.: Наука, 1981. С. 210–231.

Гершензон С.М. Основы современной генетики. 2-ое изд. Киев.: Наукова думка, 1983. 560 с.

Гершкович И. Генетика. М.: Наука, 1968. 698 с.

Гилберт С. Биология развития. В 3-х томах. Перевод с англ. М.: Мир, 1995. Т. 3. Гл. 17, 18, 21.

Глазер В.М. Конверсия гена//Соросовский образовательный журнал, 2000. Т 6. № 1. С. 23–31.

Глазер В.М., Глазунов А.В. Молекулярно-генетический анализ репарации двунитевых разрывов ДНК у дрожжей-сахаромицетов//Генетика, 1999. Т. 35. С 1449–1469.

Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. М.: Мир, 2002. 589 с.

Горбунова В.Н. Молекулярные основы медицинской генетики. С-Пб.: Интермедика, 1999. 212 с.

Горбунова В.Н., Баранов В.С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. С-Пб.: Специальная литература, 1997. 287 с.

Дубинин Н.П. Общая генетика. 3-е изд. М.: Наука, 1986. 559 с.

Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Мутагены (скрининг и фармакологическая профилактика воздействия). М.: Медицина, 1998. 327 с.

Жестяников В.Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение. Л.: Наука, 1979. 285 с.

Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика. Новосибирск.: Изд. Новосибирского Университета, 2002. 459 с.

Зенгбуш П. Молекулярная и клеточная биология. В 3-х т. Перевод с англ. М.: Мир, 1982. Т. 2. Гл. 44.

Зимина Л.Н., Билева Д.С., Малиновский А.А. Гетерозис по плодовитости и длительности жизни у *Drosophila melanogaster*//Генетика, 1977. Т. 13. № 11. С. 1960–1965.

Иванов В.И. Хренников В.Ю. Основы обшей генетики. Краткое пособие. М.: РГМУ, 1992. 128 с.

Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии. М.: МИА, 2002. С. 500–528.

Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции. М.: Высшая школа, 1989. 591 с.

Корочкин Л.И. Биология индивидуального развития. М.: Издательство МГУ, 2002. 264 с.

Кузнецова О.В. Изучение механизмов образования диплоидных яйцеклеток у *Drosophila melanogaster.* Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Л.: 1980. 112 с.

Курило Л.Ф. Генетический контроль за половой дифференцировкой и некоторыми этапами репродукции. Сб. Многоликость современной генетики. Уфа.: Гилем, 2000. С. 51–66.

Кухлинг Х. Справочник по физике. Перевод с англ. М.: Мир, 1982. С. 288–289.

Лаврик О.И., Хлиманков Д.Ю., Ходырева С.Н. Репликативный комплекс эукариот и его исследование с помощью аффинной хроматографии. Молекулярная биология. 2003. Т. 37. № 4. С. 563–572.

Левонтин Р. Генетические основы эволюции. Перевод с англ. М.: Мир, 1978. 351 с.

Лобашев М.Е. Генетика. 2-е изд. Л.: Издательство ЛГУ, 1967. 751 с.

Льюин М. Гены. Перевод с англ. М.: Мир, 1987. 544 с.

Мазер К., Джинкс Дж. Биометрическая генетика. Перевод с англ. М.: Мир, 1985. С. 42–54.

Медведев Н.Н. Практическая генетика. М.: Наука, 1968. Гл.2.

Митрофанов В.Г. Доминантность и рецессивность. М.: Наука, 1994. 48 с.

Музрукова Б.Б. Т.Х. Морган и генетика. Научная программа школы Т.Х. Моргана в контексте развития биологии XX столетия. М.: Издательский дом «Грааль», 2002. 310 с.

Мюнтцинг А. Генетика. Перевод с англ. М.: Мир, 1967. Гл. 5.

Пузырев В.П., Степанов В.А. Патологическая анатомия генома человека. Новосибирск.: Наука, 1997. 224 с.

Православие и проблемы биоэтики. Вып. 1. М.: Жизнь, 2001. 126 с.

Рокицкий П.Ф. Основы вариационной статистики для биологов. Минск.: Изд. БГУ, 1961. Гл. 7.

Сингер М., Берг П. Гены и геномы. В 2-х т. Перевод с англ. М.: Мир, 1998. Т. 1. 373 с.

Современные методы диагностики наследственных болезней. Материалы научно-практической конференции. Москва. 20–21 ноября 2001 г. 186 с.

Спивак И.М. Наследственные заболевания с первичными и вторичными дефектами репарации ДНК//Цитология. 1999. Т. 41. С. 338–379.

Тимофеев-Ресовский Н.В. О Менделе//Бюллетень МОИП. Отд. Биол. 1965. Т. 70. Вып. 4. С. 4–21.

Тимофеев-Ресовский Н.В., Иванов В.И. Некоторые вопросы феногенетики. Сб. Актуальные вопросы современной генетики. М.: Издательство МГУ, 1966. С. 114–130.

Тимофеев-Ресовский Н.В., Циммер К.Г., Дельбрюк М. О природе генных мутаций и структуре гена. В кн. Н.В. Тимофеев-Ресовский «Избранные труды». М.: Медицина, 1996. С.105–153.

Тимофеев-Ресовский Н.В., Яблоков А.В., Глотов Н.В. Очерк учения о популяции. М.: Наука, 1973. 276 с.

Фогель Ф. Мотульски А. Генетика человека. В 3-х т. М.: Мир, 1989–1990.

Фолконер Д.С. Введение в генетику количественных признаков. М.: Агропромиздат, 1985. Гл. 6.

Хесин Р.Б. Непостоянство генома. М.: Наука, 1984. 472 с.

Черных В.Б., Курило Л.Ф. Генетический контроль дифференцировки пола у человека//Генетика. 2001. Т. 37, № 11. С. 1317–1329.

Черных В.Б., Курило Л.Ф. Генетический контроль гормональной регуляции дифференцировки пола и развития половой системы у человека//Генетика. 2001. Т. 37, № 11. С. 1475–1485.

Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология. Перевод с англ. М.: Изд-во НИИ биомедицинской химии РАМН, 1999.372 с.

An International System for Human Cytogenetic Nomenclature ISCN – 1995. Mitelman F. (ed.) S. Karger, Basel. 1995. 114 pp.

Ashby J., Waters M.D., Preston J. et al. IPCS harmonization of methods for the prediction and quantification of human carcinogenic/mutagenic hazards and for indicating the probable mechanism of action of carcinogens. Mutat. Res. 1996. Vol. 252. P. 153–157.

Bielinsky A., Gerbi S.A. Where it all starts: eukariotic origins of DNA replication. Journal of Cell Science. 2002. V. 114. N 4. P. 643–649.

Bioethics in Asia. Fujiki N., Macer D.R.J. (eds.). Tsukuba: EUBIOS Ethics Institute. 1998. 478 pp.

Bopp D. Sex Determination in *Drosophila*. Genetics of *Drosophila* and other Insects. In: Encyclopedia of Genetics. Ed. Eric C.R. Reeve Fitzroy Deaborn Publishers. London. 2001. P. 179–190.

Brophy P.D., Ostrom L., Lang K.M. & Dressier G.R. Regulation of ureteric bud outgrouth by Pax2-dependent activation of the glial derived neurotrophic factor gene. Development. 2001. V. 128. P. 4747–4756.

Cohen M., Jr. The Child with Multiple Birth Defects. N.-Y. Raven Press. 1982. 189 pp.

Genomics and World Health. Geneva. WHO. 2002. 125 pp.

Griffiths A.J.F., Miller G.H., Suzuki D.T., Levontin R. An Introduction to Genetic Analysis. 7-th ed. N.-Y. 2000. P. 365–371; 510–517; 626–628.

Morgan T.H., Sturtevant A.H., Muller H.J., Bridges C.B. The Mechanism of Mendelian Heredity. New York. Henry Holt &. Co. 1923. 357 pp.

Muller R.F. & I.D. Young. Emery's Elements of Medical Genetics. 8-th Ed. Harcourt Publishers Limited. Edinburg. London. N-Y. 2001. P. 81–96.

Universal Declaration on the Human Genome and Human Rights. Paris. UNESCO. 1997. 9 pp.

Vanio S. & Lin Y. Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting. Nature Rev. Genetics. 2002. V. 3. P. 533–543.

Часть II

МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА

Глава

19 НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ И ПАТОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА

19.1. ПРЕДМЕТ И ЗАДАЧИ МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКИ

Медицинская генетика – важный раздел современной генетики, изучающий роль наследственных факторов в возникновении патологических симптомов и признаков в организме человека. Человек, как объект генетических исследований сложен и вместе с тем удобен. Сложность связана с существованием ряда ограничений, возникающих при проведении научного эксперимента. Например, к человеку абсолютно неприменим метод экспериментальной гибридизации, не всегда возможно одновременное обследование представителей трех и более поколений семьи и т.д. С другой стороны, бурное развитие молекулярной и клеточной биологии существенно расширило наши представления о биохимических, физиологических, молекулярных и других важных процессах, происходящих в организме здорового человека, что позволяет судить о тонких патогенетических механизмах отдельных клинических симптомов и заболеваний. Известно, что наследственные болезни – это часть общей наследственной изменчивости человека как биологического вида, обеспечивающей его эволюцию и приспособление к меняющимся условиям внешней среды. Кроме того, существует довольно много человеческих популяций, характеризующихся высоким уровнем инбридинга и изоляции. Изучение таких популяций позволяет судить о механизмах распространения мутантных генов и поддержания их частоты на определенном уровне из поколения в поколение.

Развитие медицинской генетики происходило скачкообразно. Каждый новый прорыв был результатом появления нового эффективного метода исследования. Так, ощутимого прогресса в области медицинской генетики удалось достигнуть в 50-е годы XX столетия, когда были разработаны методы кариотипирования. Именно в это время, выявлены и охарактеризованы основные синдромы трисомий по аутосомам и половым хромосомам. Однако революционный прорыв в медицинской генетике стал возможен благодаря молекулярно-генетическим методам и, прежде всего, гибридизации нуклеиновых кислот. Метод амплификации ДНК (получение множества копий нужного фрагмента генома) в значительной степени компенсировал отсутствие гибридизационного метода в медицинской генетике. Использование молекулярных подходов позволило не только картировать гены человека, но и идентифицировать в них основные типы мутаций, обусловливающих развитие наследственных заболеваний. К настоящему времени картировано более 1000 генов человека, контро-

лирующих возникновение той или иной патологии; больше половины этих генов клонированы. Данные о вновь идентифицированных генах и болезнях со всего мира стекаются в лабораторию генетики, руководимую профессором Мак-Кьюсиком в Университете Джона Хопкинса в Балтиморе, США. Каждое идентифицированное наследственное заболевание вносится в созданный в данной лаборатории «Каталог наследственных болезней человека», ему присваивается индивидуальный номер, первая цифра которого определяет тип наследования болезни. Так, для аутосомно-доминантного типа используется номер 1, для аутосомно-рецессивного – 2; 3 и 4 – для X- и Y-сцепленного типов, соответственно, и 5 – для митохондриальных заболеваний. В последние годы в Каталоге появился еще один номер – 6. К этой группе относят вновь выделенные генетические варианты уже известных нозологических форм и идентифицированных генов. Большую роль в решении проблем медицинской генетики играет создание и исследование генетических линий животных, имеющих сходные нуклеотидные последовательности кодирующих, регуляторных и интронных областей многих генов с генами человека. Проводимые параллельные исследования генома человека и мыши позволяют существенно повысить эффективность исследования молекулярных основ наследственных болезней человека. Использование лабораторных животных, имеющих мутации в генах, гомологичных генам человека, в ряде случаев дает единственную возможность выявления основ патогенеза наследственных болезней.

Изучение реализации генетических механизмов на клеточном, молекулярном, организменном и популяционном уровнях привело к выделению различных разделов медицинской генетики – популяционной, клинической, биохимической, цитогенетики, иммуногенетики, генетики развития, генетики соматических клеток, молекулярной генетики, фармакогенетики и других.

Популяционная генетика изучает поведение мутантных генов в популяциях человека. Этот раздел медицинской генетики посвящен анализу влияния генетико-автоматических процессов (дрейфа генов), миграции, отбора, скорости мутационного процесса на частоту генов и отдельных генотипов. Одновременно с этим популяционная генетика изучает эпидемиологию (распространенность и спектр) наследственных заболеваний в популяциях с различной структурой.

Биохимическая генетика – изучает особенности патогенетических механизмов наследственных заболеваний, протекающих с нарушением различных биохимических процессов в организме человека. Особое внимание исследователей, работающих в области биохимической генетики, привлекают наследственные болезни обмена веществ, то есть, те заболевания, при которых известен белковый продукт гена и идентифицированы основные пути его биохимических превращений в организме. Один из разделов биохимической генетики, интенсивно разрабатываемых в последние годы – так называемая **протеомика** – наука, основной задачей которой является идентификация белковых продуктов, экспрессируемых генами, и анализ их биохимических превращений.

Клиническая генетика – наиболее практически важный раздел медицинской генетики, направленный на выявление симптомов наследственных болезней и разработку способов их профилактики и лечения. Одно из наиболее перспективных направлений клинической генетики – анализ признаков и показателей, характеризующих

генетически гетерогенные варианты сходных по клиническому течению заболеваний. Выявление таких особенностей будет способствовать созданию алгоритма их адекватной диагностики с помощью молекулярно-генетических и биохимических методов обследования. К сожалению, в настоящее время, для большинства наследственных заболеваний не разработаны методы эффективного лечения, в связи с чем на первый план выступают проблемы их точной диагностики и профилактики. Наиболее эффективным способом профилактики наследственных заболеваний является медико-генетическое консультирование семей. Более подробно о проведении медико-генетического консультирования будет рассказано в гл. 25.

Клиническая цитогенетика – раздел современной медицины, занимающийся разработкой способов диагностики хромосомных аномалий у человека и изучением особенностей их клинических проявлений.

Молекулярная медицинская генетика – раздел медицинской генетики, задача которого состоит в картировании и анализе мутаций, детерминирующих различные наследственные заболевания человека.

Помимо этих основных разделов медицинской генетики, выделяют *иммуногенетику*, изучающую генетические механизмы иммунного ответа, *онкогенетику*, определяющую генетические механизмы опухолевого роста клеток, *генетику онтогенеза*, выявляющую особенности генетического контроля процессов раннего эмбрионального развития. В последние годы в рамках различных медицинских специальностей стали выделять разделы, посвященные изучению наследственных болезней, например, *нейрогенетику*, изучающую особенности наследования болезней нервной системы, *офтальмогенетику*, изучающую наследственные заболевания органа зрения и др.

19.2. КЛАССИФИКАЦИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Систематика наследственной патологии человека всегда представляла одну из самых сложных задач медицинской генетики. Классификация наследственных болезней до сих пор окончательно не разработана. Это в значительной степени связано с трудностями, возникающими при выборе критерия, который должен быть положен в основу выделения отдельных групп и форм наследственной патологии. В качестве одного из таких критериев можно было бы использовать общность патогенетических механизмов наследственных болезней. Однако такое деление может привести к тому, что в одну группу попадут заболевания, различные по клиническим проявлениям, что значительно затруднит использование этой классификации в клинической практике. В последние годы в связи со значительными успехами, достигнутыми при изучении природы большого числа наследственных заболеваний, возникли все предпосылки для создания генетической классификации, основанной на различиях в этиологии. Однако и в этом случае при создании единой классификационной структуры наследственных заболеваний возникают трудности. Они связаны с наличием

генетической гетерогенности, в результате которой может не наблюдаться прямой корреляции между генотипом и фенотипом. Хорошо известно, что идентичное по клиническим проявлениям заболевание может быть обусловлено мутациями в разных генах (*локусная гетерогенность*), в то же время, различные мутации в одном и том же гене в ряде случаев, могут детерминировать совершенно разные болезни (*аллельная гетерогенность*). Все это приводит к тому, что в настоящее время оказывается невозможным создание такой классификации наследственных болезней, которая, как мечтал выдающийся отечественный генетик С.Н. Давиденков, будет не «системой фенотипов, а системой генов».

В настоящее время в качестве рабочей классификации наследственных болезней человека, наиболее часто используется их деление на четыре основные группы:

1) болезни, обусловленные мутацией в одном гене, наследование которых подчиняется менделевским закономерностям (так называемые, *моногенные менделирующие заболевания*);

2) *хромосомные синдромы,* являющиеся следствием структурных или количественных перестроек хромосом;

3) *мультифакториальные заболевания*, для возникновения которых необходимо сочетанное действие генетических и средовых факторов, в том числе и болезни соматических клеток, к которым относятся ряд опухолей и заболевания, возникающие в связи с процессами старения организма;

4) *моногенные заболевания с нетрадиционным, отличающимся от менделевского, типом наследования* — эта группа выделена в последнее десятилетие.

В рамках этих четырех групп болезней выделяют различные подгруппы, объединенные на основании органного принципа (например, наследственные болезни нервной системы, скелета, глаз и др.), типа наследования (аутосомно-доминантные, аутосомно-рецессивные, Х-сцепленные доминантные и Х-сцепленные рецессивные заболевания), сходства патогенетических механизмов и других критериев. В рамках такой классификационной структуры, в свою очередь, выделяют подклассы в зависимости от преимущественной топографии пораженного отдела, особенностей клинических проявлений или преимущественной локализации ферментов, функции которых нарушаются при мутациях. Так, например, в структуре наследственных нейродегенеративных заболеваний выделяют нервно-мышечные, экстрапирамидные болезни, спастические параплегии, атаксии и т.д., характеризующиеся преимущественным поражением различных отделов нервной системы. В ряде случаев при классификации используют, так называемый, функциональный подход, при котором заболевания группируются на основе общности патогенетических механизмов. Например, выделяют каналопатии, возникающие при нарушении функционирования ионных каналов в различных клетках организма, болезни обмена, болезни обусловленные нарушением сигнальной трансдукции, мембранопатии, коллагенопатии, болезни нарушения репарации ДНК и др. При классификации наследственных болезней обмена в одну группу часто объединяют болезни, связанные с недостаточностью ферментов, локализованных в тех или иных клеточных органеллах, например, выделяют лизосомные, пероксисомные, митохондриальные болезни. Особенности этиологии, патогенеза, клинических проявлений, а также способы диагностики и профилактики различных групп заболеваний описаны в соответствующих разделах.

19.3. МЕТОДЫ МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКИ

В медицинской генетике используется набор специальных методов исследования, позволяющих решать как научные, так и прикладные задачи. В первом случае основной интерес исследователей направлен на установление роли наследственных факторов в возникновении того или иного заболевания человека и изучение его этиопатогенетических механизмов, во втором – на разработку способов диагностики и профилактики наследственной патологии в отягощенных семьях.

19.3.1. КЛИНИКО-ГЕНЕАЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

В основе **генеалогического метода**, предложенного в конце XIX века Ф.Гальтоном, лежит составление родословных, на основании выявления всех членов анализируемой семьи, установления степени их родства, и прослеживания того или иного признака в ряду поколений.

Применительно к целям медицинской генетики этот метод часто называют клинико-генеалогическим, так как наибольший интерес исследователей в этой области вызывает изучение сегрегации патологического симптома или болезни. Клинико-генеалогический метод наиболее универсальный и поэтому используется для решения широкого круга задач медицинской генетики. Несмотря на появление новых лабораторных методов, анализ родословных не потерял своей актуальности и успешно применяется для установления наследственного характера признаков и заболеваний. Правильно составленная родословная с выявлением всех членов семьи, установлением между ними родственных связей и оценкой состояния их здоровья позволяет с достаточно высокой вероятностью установить тип наследования и определить пенетрантность и экспрессивность мутантного гена.

Тщательный анализ клинических проявлений заболевания у больных из одной и той же семьи может быть использован при расшифровке механизмов взаимодействия генов. Например, если в семье отмечаются различия в тяжести и особенностях клинических проявлений заболевания с аутосомно-доминантными типом наследования у родителя и потомков, то можно предположить наличие модифицирующего влияния рецессивного аллеля здорового родителя на патологический аллель с доминантным эффектом. Продемонстрируем это на примере родословной, представленной на рис. 19.1.

В данной ядерной семье отец и двое его сыновей страдают заболеванием с аутосомно-доминантным типом наследования, возникновение которого обусловлено мутацией в аллеле гена A, обладающего доминантным эффектом в гетерозиготном состоянии. Второй, рецессивный, аллель, обнаруженный у больного отца, обозначим a_1. Если для данного гена существует система множественных аллелей, то здоровая мать больных сибсов может иметь различное сочетание рецессивных аллелей (в представленной родословной показано, что она имеет аллели a_1 и a_2). При выявлении различий в клинической картине заболевания у пораженного отца, имеющего генотип Aa_1 и его детей с генотипом Aa_2, можно предположить наличие модифициру-

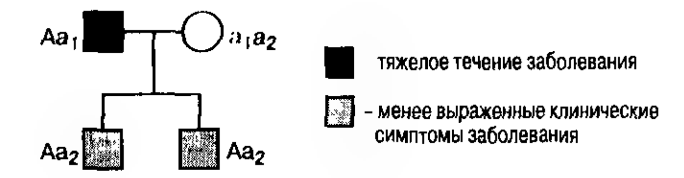


Рис. 19.1. Модифицирующее влияние рецессивного аллеля при аутосомно-доминантном заболевании

ющего влияния аллеля a_2 на доминантный аллель *А*.

Клинико-генеалогический метод демонстрирует генетическую гетерогенность многих заболеваний, например, таких как альбинизм, тугоухость, наследственная моторно-сенсорная нейропатия и других.

В последние годы возросла роль клинико-генеалогического метода при проведении анализа сцепления локуса заболевания с полиморфными маркерами ДНК. Именно тщательно собранные родословные и идентификация генетического статуса всех ее членов могут быть основой для локализации генов и их последующей идентификации.

Применение клинико-генеалогического метода может быть полезным и при изучении интенсивности мутационного процесса.

Медико-генетическое консультирование немыслимо без клинико-генеалогического метода, поскольку именно он позволяет выявить в родословной лиц, являющихся гетерозиготными носителями мутантного гена, и определить прогноз потомства в семье, где имеется или предполагается рождение ребенка с наследственной патологией (гл. 25).

Клинико-генеалогический метод включает три основных этапа: *клиническое обследование, составление родословной и генеалогический анализ.*

При составлении родословных принято использовать унифицированные символы, представленные на рис. 19.2. Составление родословной начинается с **пробанда** (от англ. *probe* - зондирование), т.е. с лица, первым попавшего в поле зрения исследователя. Чаще всего им оказывается больной или носитель признака, сегрегацию которого необходимо проследить при анализе родословной. Однако им может быть и любой родственник больного, обратившийся за медико-генетической консультацией. Всех детей одной супружеской пары называют **сибсами** (от англ. аббревиатуры SIBS: SIsters - BrotherS). Если общим у братьев и сестер является только один из родителей, их называют **полусибсами**. В родословной сибсы располагаются в порядке рождения горизонтально слева направо, начиная со старшего.

При составлении родословной желательно получить сведения о максимальном количестве родственников 3-4 поколений. Чаще всего родословная бывает представлена последовательными, соединенными между собой горизонтальными рядами (рис. 19.3, *а*), однако, в том случае, если членов родословной оказывается очень много, эти ряды могут быть представлены в виде концентрических окружностей (рис. 19.3, *б*). Все члены одного поколения располагаются строго в одном ряду. Ряды поколений обозначают римскими цифрами. Представители одного поколения нумеруются арабскими цифрами, последовательно – слева направо. Таким образом, каждый член родословной имеет свой шифр двоичной системы, например I-1, II-1, II-2 и т.д. (см. рис. 19.3, *а*)

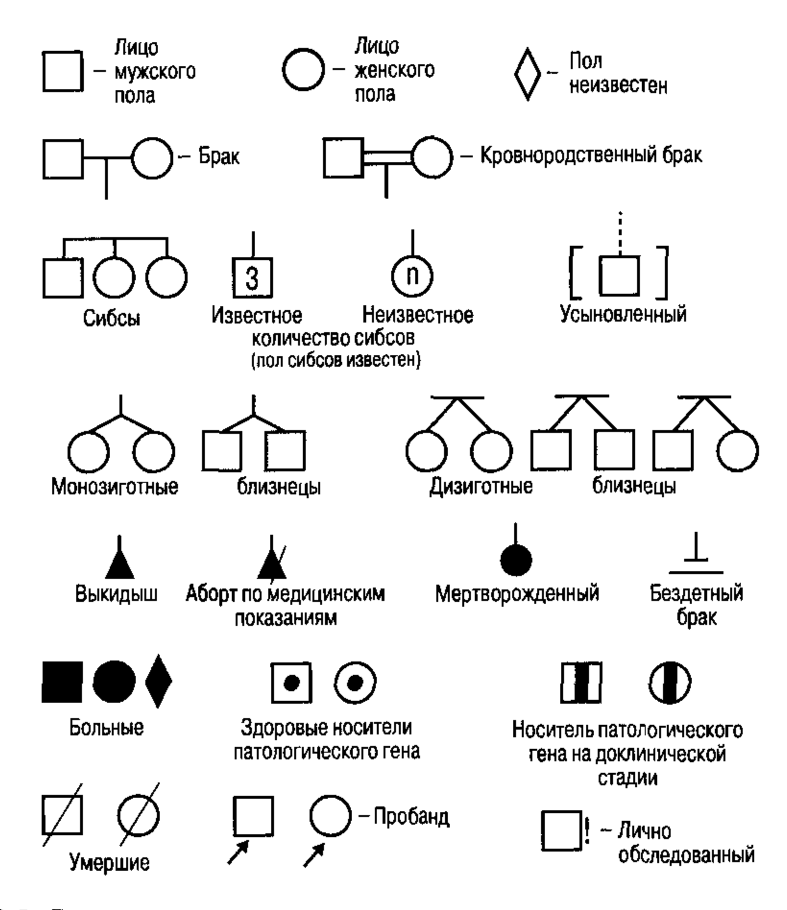


Рис. 19.2. Символы, используемые при составлении родословных

Необходимо указывать возраст всех членов родословной, так как некоторые заболевания проявляются в различные периоды жизни, и отмечать лично обследованных знаком «!». Супруги родственников пробанда, если они здоровы, могут не изображаться. При рассмотрении нескольких признаков прибегают к буквенным или штриховым изображениям внутри символов.

Далее, внизу под родословной записывается легенда (данные о состоянии здоровья родственников, причинах и возрасте смерти и др.) и указывается дата составления этого документа.

Использование клинико-генеалогического метода предполагает тщательное клиническое обследование всех членов родословной с целью выявления у них стертых или атипичных признаков заболевания. Иногда это оказывается возможным только с помощью дополнительных параклинических методов исследования (например, рентгенологических, биохимических, электрофизилогических, морфологических и других). При невозможности обследования всех членов родословной сбор информа-

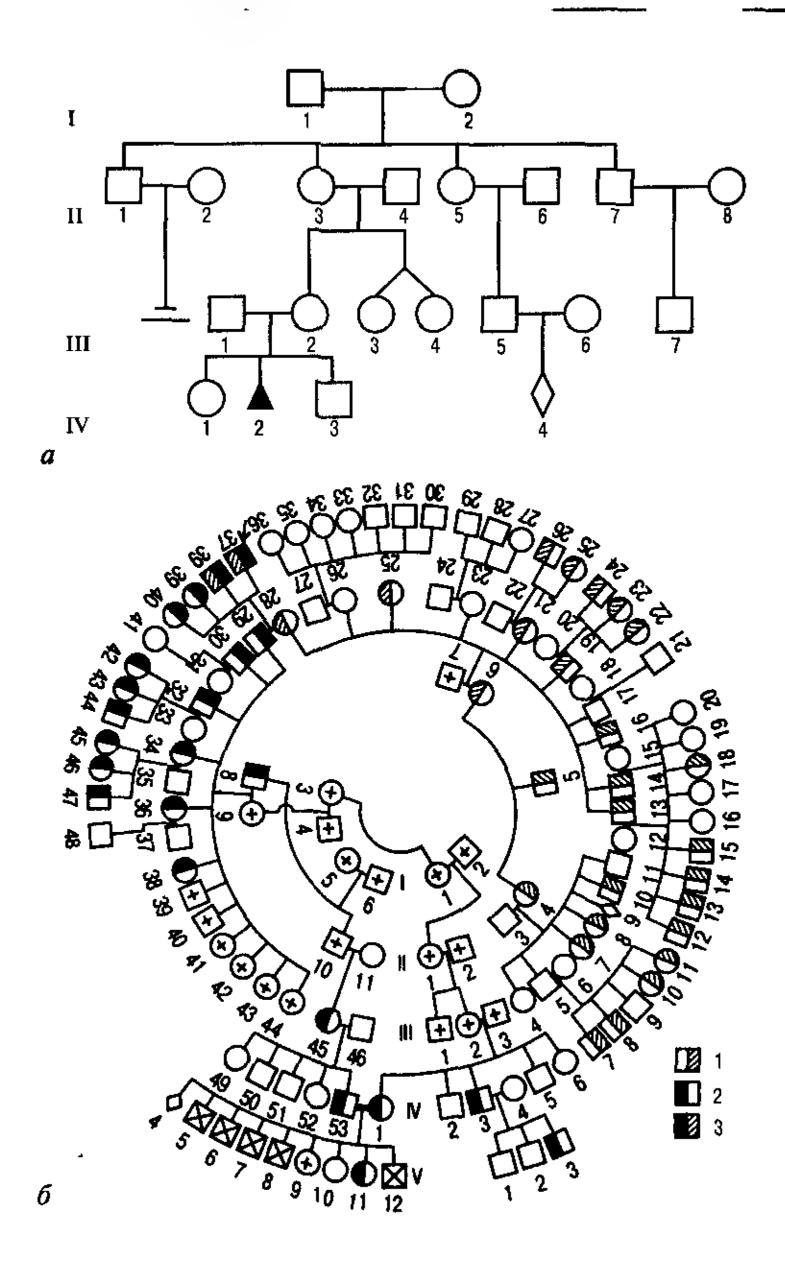


Рис. 19.3. Примеры составления родословных:

а - классическая родословная: пример нумерации в ряду поколений; б - концентрическая родословная. (Из: Бочков, 2001)

1 - больные гемоглобинозом Е; 2 - больные талассемией, 3 - больные гемоглобинозом Е и талассемией

нии о наличии в семье пробанда заболеваний или признаков, указывающих на таковое, можно проводить разными методами. Например, путем опроса или анкетирования. К сожалению, в настоящее время составление родословных представляет собой сложную задачу, вследствие того, что люди зачастую имеют скудные, отрывочные или неточные сведения о своих родственниках и состоянии их здоровья. Все это затрудняет постановку диагноза.

Сбор анамнестических данных проводится по определенной схеме.

1. *Сведения о пробанде* — анамнез заболевания, включающий начальные признаки и возраст их манифестации, последующее течение болезни; если это ребенок – сведения о раннем психомоторном и последующем умственном и физическом развитии.

2. Данные о *сибсах* (братьях и сестрах) и *родителях пробанда* – возраст, здоровы или больны, проведение аналогии с заболеванием пробанда в случае болезни.

3. *Сведения о родственниках со стороны матери* (родители, их дети, внуки).

4. *Сведения о родственниках со стороны отца* (родители, их дети, внуки).

Полученные данные записываются в этой последовательности в медико-генетическую карту. Чем больше родственников пробанда будет непосредственно опрошено или обследовано, тем выше шансы на получение более достоверных и полезных сведений, так как наследственные заболевания в семье часто скрываются или неправильно диагностируются. Необходимо внимательно анализировать сообщения об инфекциях и травмах, характер течения которых может указывать на сопутствующее наследственное заболевание или предрасположенность к нему. Важно учитывать генетическую гетерогенность и варьирующую экспрессивность наследственных заболеваний.

При сборе анамнестических данных необходимо выяснять акушерский анамнез у женщин: как протекала беременность, на каком фоне она наступила, подробности о всех случаях спонтанных абортов, мертворождений, наличии бесплодных браков и ранней детской смертности, что наиболее важно при подозрении на хромосомную патологию. Следует отмечать девичьи фамилии женщин и место жительства семьи и предков, национальность, что помогает выявить кровно-родственные браки, которые увеличивают вероятность рождения детей с АР наследственным заболеванием. Если родители пробанда родом из одного небольшого по числу жителей населенного пункта (особенно изолированного географически), можно предположить, что они имеют общих предков, а, следовательно, и общие патологические гены (случайный инбридинг).

При составлении родословных необходимо учитывать наличие и характер профессиональных вредностей (особенно для родителей, имеющих детей с врожденными пороками развития или хромосомной патологией), факторов, влияющих на возникновение патологии плода и новорожденного (прием лекарственных препаратов, заболевания матери, воздействие химических и радиационных мутагенов), время их действия (до или во время беременности).

Заключительный этап – анализ родословной – требует хорошего знания критериев типов наследования, которые представлены в гл. 21 и 22. Кроме того, необходимо учитывать возможность фенокопий наследственных заболеваний.

19.3.2. [illegible]

Близнецовый мет[illegible] [illegible]
признаков и хар[illegible]
средой. С помощью [illegible]
положенности к мног[illegible]
проявления тех или иных [illegible]
лезными для количественной оц[illegible]
отдельных признаков, в связи с чем, близнецовый м[illegible] одним из
важных методов количественной генетики.

Таким образом, близнецовый метод, также как и анализ родословной, позволяет установить наследственный характер признаков, и это единственный метод, выявляющий соотносительную роль (удельный вес) генетических (наследственных) и средовых факторов в формировании признака. Авторство близнецового метода приписывают Ф.Гальтону (1876), который сформулировал концепцию «природа» или «воспитание» (Nature or Nurture), и изложил основные положения вопроса в книге «Близнецы, как критерий силы наследственности и среды». Этот метод сыграл очень большую роль в развитии генетики человека, и одно время рассматривался как своеобразная «королевская дорога» в генетическом анализе человека. В последние годы, несмотря на возможности близнецового метода для понимания роли наследственности и среды, он не имеет столь широкого практического применения, как ранее. Это обусловлено появлением более точных современных методик, дающих однозначный ответ относительно генетической предрасположенности к конкретному заболеванию.

Принцип близнецового метода прост и заключается в сравнении моно- и дизиготных близнецов. Близнецы – потомство, состоящее из одновременно родившихся особей у одноплодных млекопитающих (человека и животных). Монозиготные близнецы развиваются из одной оплодотворенной яйцеклетки и имеют 100% общих генов, т.е. выявляемые между ними различия не связаны с наследственным фактором. Дизиготные близнецы развиваются из разных яйцеклеток, оплодотворенных разными спермиями. Они имеют 50% общих генов, как обычные сибсы, но, благодаря одновременному рождению и совместному воспитанию имеют общие средовые факторы, следовательно, степень их различия определяется степенью несходства генотипов. Результатом сравнения этих двух групп близнецов является расчет показателей соответствия (*конкордантности*) и несоответствия (*дискордантности*), а также вычисление частоты возникновения заболевания /признака в каждой группе близнецов.

Методологические основы близнецового метода были разработаны в 1924 г. Сименсом, который показал необходимость исследования близнецов обоих типов и возможность надежной диагностики типа зиготности на основании анализа большого числа критериев. Кроме того, Сименс сформулировал принципы составления близнецовой выборки, создав предпосылки для изучения генетики нормальной изменчивости.

Таким образом, близнецовый метод включает следующие этапы:

1) *составление выборки,*

2) *определение типа зиготности,*

3) *собственно оценка результатов сопоставления пар.*

При составлении выборки необходимо соблюдать ряд условий:

1) обязательно обследовать обоих членов близнецовой пары (из выборки исключаются пары в случае невозможности обследования одного из близнецов);

2) иметь статистически достаточное количество пар близнецов, причем соотношение пар близнецов N_{DZ}/N_{MZ} должно совпадать с таковым для изучаемой популяции, так как и процент многоплодия, и указанное соотношение варьируют у разных рас и народов. Рассчитать количество ди- (N_{DZ}) и монозиготных (N_{MZ}) пар достаточно легко:

а) $N_{DZ} = 2 \times$ (количество разнополых пар), так как рождение однополых и разнополых дизиготных близнецов равновероятно, отсюда $N_{MZ} = N_{DZ+MZ} - N_{DZ}$;

б) или по формуле Вайнберга

$$\frac{DZp}{N_{DZ}} = \frac{2pq}{p^2 + 2pq + q^2} \qquad N_{DZ} = DZp/2pq; \quad N_{MZ} = N_{DZ+MZ} - N_{DZ}$$

3) учитывать соответствие возраста и пола близнецов в сравниваемых выборках.

Для установления типа зиготности можно использовать следующие методы: метод оценки количества плодных оболочек (плаценты и хориона) и метод полисимптомного сходства, предложенный Сименсом и Фершуером в 1924 г. и основанный на сравнении партнеров по внешним морфологическим признакам. Но самым надежным диагностическим тестом является метод оценки частоты встречаемости моногенных полиморфных признаков, впервые примененный Смитом и Пенроузом при анализе зиготности близнецов по группам крови. Для установления типа зиготности этим методом можно использовать анализ эритроцитарных и лейкоцитарных антигенов, белков сыворотки крови, ПДРФ-маркеров, восприятие вкуса фенилтиокарбамида, а также содержание различных веществ в слюне, моче, поте. Сущность этого метода заключается в вычислении по теореме Байеса вероятности дизиготности и монозиготности пары близнецов одного пола при наличии у них одинаковых маркеров. Вероятность наличия у дизиготных близнецов одинаковых показателей в n-системах, равна произведению вероятностей по каждому тесту ($Pd = Pd1 \times Pd2 \times \ldots \times Pdn$), а то, что они монозиготны – $Pm = (1 - Pd)$. Результаты расчетов вероятностей встречаемости признаков показали, что сходство дизиготных близнецов по пяти локусам от двух гетерозиготных родителей ожидается лишь в 1,4%.

Оценка результатов сопоставления пар включает расчет конкордантности пар, а также доли наследственной обусловленности признака.

Конкордантность (С) – показатель идентичности близнецов пары по определенному признаку; соответствует доле сходных (конкордантных) по изучаемому признаку пар среди обследованных пар близнецов для каждой группы):

$$C_{MZ} = (n_{MZ}/N_{MZ}) \times 100\%, \quad C_{DZ} = (n_{DZ}/N_{DZ}) \times 100\%,$$

где n – число пар близнецов соответствующей группы, у которых признак отмечен у обоих партнеров, N – общее число обследованных близнецовых пар этой же группы.

Дискордантность (D) по признаку, как правило, рассчитывается для дизиготных близнецов, как доля дискордантных (т.е. признак выявлен только у одного из двух

партнеров) по изучаемому признаку пар среди всех обследованных дизиготных пар близнецов или по формуле:

$$D_{DZ} = 100\% - C_{DZ}.$$

Аналогично можно рассчитать и дискордантность для монозиготных близнецов.

Существуют таблицы конкордантности близнецов по различным признакам и заболеваниям, составленные эмпирически (табл. 19.1.). Чем больше наследственная компонента, тем больше различаются по конкордантности моно- и дизиготные близнецы. Для определения доли наследственной обусловленности признака рассчитывается коэффициент наследуемости (H) по формуле Хольцингера:

$$H = (C_{MZ} - C_{DZ})/(1 - C_{DZ}) \quad \text{или} \quad H = (C_{MZ} - C_{DZ})/D_{DZ}.$$

Если $H \geqslant 0{,}7$ (70%), то решающая роль в проявлении признака принадлежит наследственным факторам, если показатель H находится в интервале 0,3–0,7 (30–70%), то на проявление признака оказывают влияние как наследственные, так и внешнесредовые факторы с тем или иным преимуществом. Основная роль факторов внешней среды в проявлении признака предполагается, если $H \leqslant 0{,}3$ (30%).

Близнецовые исследования, (определение коэффициента наследуемости и конкордантности пар) сыграли значительную роль при изучении генетики поведения, многих инфекционных и, так называемых, мультифакториальных заболеваний.

Довольно часто в генетике человека используется не классический близнецовый метод, а его модификации, например, для изучения возможностей улучшения опре-

Таблица 19.1. **Конкордантность моно- и дизиготных близнецов**

Признак	Монозиготные близнецы		Дизиготные близнецы	
	Количество обследованных пар	С, %	Количество обследованных пар	С, %
Косолапость	35	22,9	135	2,3
Врожденный вывих бедра	29	41,4	109	2,8
Расщелины губы и нёба	125	29,6	236	4,7
Рак	196	17,4	546	10,8
Ишемическая болезнь сердца	21	19	47	8,5
Диабет	181	55,8	394	11,4
Атопии	12	50	23	4,4
Желчнокаменная болезнь	49	26,6	62	6,5
Псориаз	31	61	46	13
Туберкулез	381	51,6	843	22,2
Саркоидоз	4	50	11	8,5
Корь	1629	97,4	2016	94,3
Скарлатина	321	54,6	381	47,1

деленных характеристик интеллекта путем психологической тренировки – метод контроля по партнеру, для исследования сахарного диабета – метод близнецовых семей. Наследование психологических особенностей личности и интеллекта удобно анализировать на разлученных близнецах, которые были разделены в младенческом или раннем возрасте и воспитывались раздельно, не имея влияния общей среды и специфического взаимодействия между собой.

Однако не всегда возможно получить достоверные данные при изучении признаков близнецовым методов. Это связано с систематическими различиями между близнецами и не близнецами по ряду признаков (по массе, частоте врожденных аномалий, индексу IQ) и психологическими и социальными особенностями развития близнецов в постнатальный период. Эти факторы и являются ограничениями использования данного метода.

19.3.3. ПОПУЛЯЦИОННО-СТАТИСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Методы, используемые для установления частот генов и генотипов в популяции, демонстрирующие характер их изменения под влиянием окружающей среды и различных факторов популяционной динамики, носят название *популяционно-статистических.*

С помощью этих методов можно:

- определить частоты генов, степень гетерозиготности и полиморфизма,
- установить, как меняются частоты генов под действием отбора,
- выявить влияние факторов популяционной динамики на частоты тех или иных генотипов и фенотипов,
- проанализировать влияние факторов внешней среды на экспрессию генов,
- определить степень межпопуляционного генетического разнообразия и вычислить генетическое расстояние между популяциями.

Так же методы популяционно-статистического анализа могут быть использованы для определения и подтверждения типов наследования заболевания, являясь основой применения математической статистики в клинико-генетическом анализе.

Популяционно-генетические исследования включают следующие этапы:

1) подбор популяции с учетом демографических характеристик,

2) сбор материала,

3) выбор метода статистического анализа.

Генетическое изучение популяций человека предполагает знание их демографических характеристик (размер популяций, рождаемость, смертность, возрастная структура, национальный состав), а также географических и климатических условий жизни, религиозных убеждений и т.д. Это связано с некоторыми особенностями популяций человека, которые могут быть панмиксными (случайные браки) и инбредными (высокая частота кровнородственных браков). В популяциях человека формирование субпопуляций связано с такими формами изоляции, которые свойственны только человеку, например расовая, социальная (социальное положение, экономические, этнические, языковые, административные), конфессиональная и идеологическая. Все это необходимо учитывать при интерпретации полученных при популя-

ционно-генетических исследованиях результатов. Во избежание получения недостоверных результатов, выбираемая для изучения популяция также не должна быть очень большой или очень малой. Чем больше по размеру популяция (но не до бесконечности), тем выше уровень ее разнообразия и тем сложнее ее генетическая структура, а также ближе соответствие между реально наблюдаемыми и ожидаемыми генными частотами. Так для генетических исследований оптимальным считается размер популяции с численностью от 0,5–5,0 млн. человек.

В настоящее время для сбора материала при проведении популяционно-генетического исследования используется обзорный метод и его различные модификации, т.е. можно исследовать всю наследственную патологию, или отдельную группу заболеваний, или только одно заболевание, но изучая все население выбранного региона.

Наследственные заболевания распределены по различным регионам земного шара, среди разных рас и народностей неравномерно, а знания о распределении частот заболеваний и количестве гетерозигот в регионе способствуют правильной организации профилактических мероприятий. Если известна частота заболевания в популяции, и при допущении, что эта популяция находится в генетическом равновесии по данному признаку, для расчета частот генотипов и фенотипов наиболее широко применяется формула Харди–Вайнберга. Для диаллельной системы – она имеет вид $p^2 + 2pq + q^2 = (p + q)^2 = 1$, для трехаллельной – $(a + b + c)^2 = 1$). (Подробнее о законе Харди–Вайнберга и условиях его выполнения см. гл. 17). Например, частота ФКУ в популяции составляет 1:10000, т.е. $q^2 = 0{,}0001$, значит $q = 0{,}01$. По закону Харди–Вайнберга $p + q = 1$, отсюда $p = 1 - q = 1\text{-}0{,}01 = 0{,}99$, а $2pq = 2 \times 0{,}99 \times 0{,}01 = 0{,}0198$. Таким образом, частота гетерозигот по гену ФКУ в изучаемой популяции составляет приблизительно 2%.

На практике при расчете частоты гетерозигот иногда принимают приближенное значение p ($p = 1$) и, соответственно, $2pq \approx 2q$. Рассмотрим следующий пример. Частота муковисцидоза 1:2500, значит $q^2 = 0{,}0004$, $q = 0{,}02$. По определению $p + q = 1$, отсюда $p = 1 - q = 1 - 0{,}02 = 0{,}98$, а $2pq \approx 2q = 2 \times 0{,}02 = 0{,}04$. Таким образом, частота гетерозигот по гену муковисцидоза в изучаемой популяции составляет приблизительно 4%.

Для установления и подтверждения типа наследования заболеваний необходимо проверить соответствие сегрегации (расщепления) по исследуемому признаку в отягощенных семьях данной популяции менделевским закономерностям. При правильном сборе материала соотношение больных и здоровых сибсов одного и того же поколения и сегрегационная частота (частота с которой ген сегрегирует в исследуемых семьях) будут соответствовать определенному типу наследования. *Методом χ-квадрат* подтверждается соответствие количества больных и здоровых сибсов для аутосомно-доминантной патологии в семьях с полной регистрацией (через больных родителей):

$$\chi^2 = (О_б - Н_б)^2/О_б + (О_{зд} - Н_{зд})^2/О_{зд},$$

где О – ожидаемое, Н – наблюдаемое количество больных или здоровых сибсов в выявленных семьях.

Для расчета сегрегационной частоты (ρ) можно использовать ряд методов: метод сибсов Вайнберга, пробандовый метод.

Методы сибсов Вайнберга и пробандовый используются в случае регистрации семей через больных детей: при рецессивной патологии (родители здоровы) и при аутосомно-доминантных заболеваниях в случае неполной регистрации.

Метод сибсов Вайнберга может применяться только при исследовании всей популяции или случайной выборки, в которой каждый больной имеет одинаковую вероятность попасть в нее и все больные имеют равные шансы стать пробандом, иными словами все пораженные должны являться пробандами. Сущность этого метода состоит в подсчете отношения суммарного количества больных сибсов к общему количеству их здоровых братьев и сестер, соответственно: $\rho = \Sigma r(r-1)/\Sigma s(s-1)$, где r – число больных в семье, s – число детей в семье.

При использовании этого метода существует вероятность получения искаженных результатов, что обусловлено следующими причинами: малое количество детей в семьях, попавших в выборку; неполная пенетрантность или скрытое носительство мутантного гена; наличие стертых форм и разных стадий болезни; пропуск семей в случае рождения здорового ребенка от гетерозиготных родителей.

Пробандовый метод применяется в практике популяционно-генетических исследований гораздо чаще. Он используется при изучении клинического материала случайно попавшего под наблюдение, т.е. если не все пораженные сибсы были зарегистрированы в качестве пробандов.

Так как на практике в поле зрения исследователя попадают семьи, в которых хотя бы один ребенок болен, для восстановления истинного соотношения при учете сибсов Вайнберг предложил исключать пробанда. В результате формула расчета сегрегационной частоты имеет вид:

$$\rho = \Sigma a(r-1)/\Sigma a(s-1),$$

где a – число пробандов, r – число больных, s – число детей в данной семье.

К тому же, при помощи пробандового метода можно оценить полноту выявления семей с данной патологией или вероятность регистрации:

$$\pi = \Sigma a(a-1)/\Sigma a(r-1).$$

При современных популяционных исследованиях используются более сложные, модифицированные и компьютеризованные методы расчетов (методы взвешенных шансов и линейной интерполяции), но основанные на тех же принципах.

19.3.4. МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КАРТИРОВАНИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Одно из важнейших направлений медицинской генетики – генетическое картирование наследственных заболеваний. В последние годы наиболее перспективным считается метод позиционного клонирования генов. Установление хромосомной локализации гена, ответственного за определенную нозологическую форму, его иденти-

фикация и выявление типов патологических мутаций, позволяет понять этиологию заболевания, и разработать наиболее адекватные методы его ДНК-диагностики профилактики.

До 1980-х годов открытие новых генов было чрезвычайно редким событием, поскольку единственный подход к их идентификации опирался на знание первичного биохимического дефекта и происходил по следующей схеме: биохимический дефект → дефектный фермент (белок) → мРНК → кДНК → геномная ДНК (ген) → локализация гена. Такой подход носит название традиционной или «*прямой*» генетики. С помощью этого подхода были картированы гены фенилкетонурии, гемоглобинопатий, гемофилии А и многие другие. Однако локусы, ответственные за большинство наследственных заболеваний не могут быть картированы в рамках стратегии «прямой» генетики, поскольку для них первичный биохимический дефект неизвестен.

Одним из важнейших достижений молекулярной генетики последнего десятилетия явилось построение подробной генетической карты генома человека с локализованными на ней примерно 6000 полиморфными ДНК-маркерами. Наличие таких маркеров, их «привязка» друг к другу и к цитогенетическим сегментам хромосом дало в руки генетиков мощный инструмент, позволяющий картировать и идентифицировать гены таких наследственных заболеваний, для которых неизвестен биохимический дефект. Метод картирования локуса заболевания на основании анализа сцепления между заболеванием и аллелями полиморфных ДНК-маркеров в семьях был предложен американским генетиком Ботстейном в 1980 г. (Botstein et al. в 1980). Такая стратегия получила название «*обратной генетики*», или позиционного клонирования. Использование этой стратегии лежит в основе крупнейшей международной программы картирования генома человека. Процедура картирования гена, ответственного за ту или иную патологию, представляет собой объемное, дорогостоящее трудоемкое, но рутинное исследование.

Позиционное клонирование включает следующие этапы:

1) подбор семей с сегрегацией наследственного заболевания в нескольких поколениях (с несколькими случаями заболевания);

2) генетическое картирование (установление сцепления локуса заболевания с полиморфным ДНК-маркером);

3) построение физической карты области локализации гена из перекрывающихся клонов геномной ДНК;

4) поиск в этих клонах возможных продуктов генов («транскриптов»);

5) исследование генов-кандидатов на наличие мутации, сцепленной с заболеванием, идентификация гена;

6) исследование белка.

В настоящее время, в связи с успехами программы по секвенированию генома человека, для многих районов генома человека имеются полные или частичные последовательности ДНК. Таким образом, отпадает необходимость в построении физической карты кандидатной области, что сильно упрощает поиск позиционных генов кандидатов.

Первый этап исследования по генетическому картированию заболевания включает формирование выборки семей с сегрегацией заболевания в нескольких поколениях. Объем этой выборки зависит от размера семей и информативности родослов

ных, плотности распределения ДНК-маркеров изучаемого хромосомного региона, а также его размера. Показано, что для картирования моногенного заболевания, не сцепленного с полом, при анализе одной большой семьи с сегрегацией заболевания в нескольких поколениях обычно достаточно набора из 300 микросателлитных маркеров, распределенных по геному с интервалом ~ 10 сМ. Наборы с числом маркеров от 300 до 600 используются для анализа выборок, состоящих из нескольких небольших семей. Анализ генетического сцепления проводится на основании частоты совместной передачи потомству двух или нескольких признаков – генетических маркеров, одним из которых может являться наследственное заболевание, а вторым – определенный аллель полиморфного локуса ДНК. Чем ближе друг к другу располагаются генетические маркеры в пределах одной хромосомы, тем больше вероятность того, что они не будут рекомбинировать и передадутся потомству совместно. Для небольших родословных и небольшого количества семей совместное наследование может быть просто случайным событием, но при большом количестве проанализированных мейозов вероятность такого случайного совпадения становится очень незначительной.

Скрининг семей на совместное наследование заболевания и аллелей полиморфных маркеров, распределенных по геному, позволяет выявить маркеры, сцепленные с геном заболевания. *Генетическое расстояние между двумя локусами* рассчитывается, исходя из частоты рекомбинаций между ними на один мейоз. При анализе сцепления важно различать фактическую рекомбинацию маркеров и кроссинговер хромосом, в результате которого рекомбинация может наступить. Лишь нечетное количество кроссинговеров приводит к рекомбинации, то есть к расхождению признаков. Однако с частотой рекомбинаций между локусами не слишком удобно работать, поскольку это неаддитивная величина, которая не может быть больше 0,5. Аддитивной величиной является генетическое расстояние *(map distance)*, равное среднему количеству кроссинговеров между двумя точками на один мейоз. Генетическое расстояние удобно использовать при построении карт сцепления и выборе маркеров для анализа сцепления.

Учитывая то обстоятельство, что маркер и исследуемый признак могут быть сцеплены не абсолютно, мы должны предполагать существование определенной частоты рекомбинаций между ними (θ). С математической точки зрения локусы не сцеплены, если $\theta = 0{,}5$, и сцеплены, если $\theta < 0{,}5$. Для количественного анализа сцепления используется величина, называемая Lod-баллом (от англ. *log odds* – логарифм шансов). Расчет величины Lod-балла проводят исходя из правдоподобия двух событий:

- наличие данного распределения двух признаков в семье F при условии, что их локусы сцеплены ($0 \leqslant \theta < 1/2$).
- наличие данного распределения аллелей двух признаков в семье F при условии, что их локусы не сцеплены ($\theta = 1/2$)

Величина Lod-балла представляет десятичный логарифм отношения правдоподобий данных гипотез и определяется по формуле:

$$Z = \log_{10}\frac{P(F|\theta)}{P(F|(1/2)}, \qquad (1)$$

где $P(F|\theta)$ – правдоподобие первой гипотезы, а $P(F|1/2)$ – правдоподобие второй гипотезы.

По определению,

$$\theta = \frac{r}{n}, \qquad (2)$$

где r – наблюдаемое число рекомбинаций, а n – число информативных мейозов.

Правдоподобие каждой из гипотез рассчитывается по формулам:

$$P(F|\theta) = \theta^r(1-\theta)^{n-r}; \qquad (3)$$

и тогда:

$$P(F|1/2) = 0{,}5^n; \qquad (4)$$

$$Z = \log_{10}\frac{P(F\,|\,\theta)}{P(F\,|\,1/2)} = \lg\left[2^n\theta^r(1-\theta)^{n-r}\right] \qquad (5)$$

Реально расчет Lod-балла проводится для различных значений θ с заданным шагом (например, θ = 0,01; 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40). Значения r и n определяются для каждого маркера из анализа наследования его аллелей в изучаемой семье.

Преимущество использования логарифмов вместо самого отношения правдоподобий состоит в том, что дает возможность суммировать Lod-баллы, полученные для нескольких семей с одним и тем же наследственным заболеванием.

Положительная величина означает, что гипотеза о сцеплении с данным θ является более вероятной, чем отсутствие сцепления, а отрицательная – наоборот. Из формулы (1) следует, что величина Lod-балла возрастает с увеличением числителя, т.е. вероятности того, что два исследуемых маркера наследуются совместно.

Согласно принципу наибольшего правдоподобия, наилучшей оценкой для реальной частоты рекомбинаций будет θ, при которой достигается максимальная величина Lod-балла. Таким образом, в результате такого рода анализа получаются две величины: θ, характеризующая степень генетического сцепления между маркерами, и Lod, характеризующий определенность, надежность вывода о наличии или отсутствии сцепления. Обычно величина Z ⩾ 3 рассматривается как доказательство сцепления (вероятность сцепления между двумя маркерами в 1000 раз больше, чем вероятность их независимой сегрегации). Эта величина выбрана не случайно, и определяется в первую очередь размером генома человека. Упрощенно критерий доказательства сцепления Z ⩾3 можно объяснить следующим образом. Поскольку размер генома составляет 3300 сМ, в нем существует 66 псевдонезависимых локусов, удаленных друг от друга на 50 сМ, и наследуемых независимо. Для достижения 95%-ой достоверности сцепления необходимо иметь двадцатикратный запас по количеству таких точек, т.е. около 1300 локусов. Десятичный логарифм данной величины равен 3.2. Таким образом, Z ⩾ 3 гарантирует с высокой достоверностью, что обнаруженное сцепление не случайно. При десятикратном увеличении размера генома для доказательства сцепления потребовалась бы величина Z ⩾ 4, а при соответствующем уменьшении – достаточна была бы меньшая величина Z . Величина Z ⩽ –2 обычно рассмат-

ривается как доказательство отсутствия сцепления (отсутствие сцепления в 100 раз более вероятно, чем его наличие) и не зависит от размеров изучаемого генома.

Значение θ, при которой достигается максимальное значение Lod-балла, может служить оценкой генетического расстояния между двумя сцепленными маркерами. Зависимость между вероятностью рекомбинации θ и генетическим расстоянием сильно отличается от линейной зависимости при θ → 0,5. Для вычисления генетического расстояния между двумя маркерами, исходя из числа наблюдаемых между ними рекомбинаций, используется формула Косамби:

$$X = 1/4 \ln \frac{1 + 2\theta}{1 - 2\theta}, \qquad (6)$$

где X – генетическое расстояние в сМ, а θ – доля рекомбинаций.

При значениях θ < 0.10 вероятность двойных кроссинговеров между двумя исследуемыми локусами очень мала, и генетическое расстояние можно принять равным рекомбинантной фракции: X = θ.

В настоящее время вычисление Lod-баллов полностью автоматизировано. Программа LINKAGE – пакет компьютерных программ, который дает оценки максимального правдоподобия параметров сцепления на основании всех данных о родословной. Эта программа вычисляет наиболее вероятные гаплотипы членов родословной и использует эти данные для вычисления наиболее вероятной частоты рекомбинации. Программа LINKAGE стала стандартным инструментом при изучении генетического сцепления у человека.

Наряду с изложенной классической схемой геномного скрининга существуют и другие варианты анализа сцепления. Выбор стратегии поиска генетического сцепления зависит от изучаемого заболевания, от структуры и количества семей, доступных для анализа. Классическая схема полногеномного скрининга имеет ряд ограничений в своем применении. Прежде всего, она плохо применима к генетически гетерогенным заболеваниям. Осуществление картирования такого заболевания, представляет собой серьезную проблему, поскольку сцепление с определенным локусом, которое наблюдается в одних семьях, может отсутствовать в других, приводя к отрицательному суммарному значению Lod-балла и последующему ложному исключению данного локуса из дальнейшего анализа. Один из возможных способов преодоления сложностей картирования, обусловленных генетической гетерогенностью, заключается в выявлении диагностического признака (или группы признаков), по которым различные генетические формы четко отличаются. К сожалению, в большинстве случаев такие клинические признаки выявить не удается. Стандартный подход при проведении картирования локусов генетически гетерогенных заболеваний заключается в выборе семей с четко определенным клиническим фенотипом. Наилучший подход, позволяющий избежать осложнений, вызванных генетической гетерогенностью, – это работа с одной родословной, достаточно большой для проведения анализа сцепления. Проводя анализ такой родословной с моногенным заболеванием, можно быть уверенным в идентичности генного локуса у больных. Другой подход к эффективному анализу сцепления состоит в изучении отдельной изолированной популяции (этнического, социального, или географического изолята). В этом случае высока веро-

ятность того, что мутация, имевшая место у одного из «основателей» популяции, получила распространение в рамках данного изолята и все больные данным заболеванием в популяции являются потомками одного и того же человека.

Еще один способ оптимизации геномного скрининга – анализ сцепления с локусами генов-кандидатов. **Геном-кандидатом** называют ген, продукт экспрессии которого может прямо или косвенно участвовать в развитии изучаемой болезни. Весьма плодотворным для поиска генов-кандидатов оказался подход, заключающийся в исследовании генов, мутации в которых приводят к сходной патологии у трансгенных животных. Например, ген *EGR2* был предложен в качестве гена-кандидата для тяжелых форм демиелинизирующих нейропатий на основании наблюдавшейся демиелинизации нервных волокон в онтогенезе у мышей, нокаутных по этому гену.

Анализ сцепления заболевания с полиморфными маркерами из области локализации генов-кандидатов в семьях предпочтительнее, чем скрининг известных генов на наличие мутаций у отдельных пациентов, поскольку позволяет избежать ошибок, связанных с методами регистрации мутаций (гл. 18).

Таким образом, различные варианты поиска сцепления могут быть успешно применены в каждой конкретной ситуации.

19.4. ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

19.4.1. МЕТОДЫ КАРИОТИПИРОВАНИЯ

19.4.1.1. ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ И КЛАССИФИКАЦИЯ ХРОМОСОМ ЧЕЛОВЕКА

Набор хромосом человека, находящихся в ядре соматической клетки, называют **кариотипом**. В 1956 г. шведские ученые Дж. Тио и А. Леван убедительно доказали, что число хромосом во всех клетках человека, кроме половых, равно 46. Этот набор хромосом называют *диплоидным* (парным). В половых клетках человека хромосом вдвое меньше –23, т.е. эти клетки гаплоидны. При оплодотворении диплоидность восстанавливается (см. гл. 2). Схема строения хромосомы представлена на рис. 19.4. В хромосоме выделяют короткое (p) и длинное (q) плечо. Концы обоих плеч хромосом называют *теломерами*. В митозе хромосомы представлены двумя сестринскими хроматидами, соединенными центромерой. Показано, что в центромере содержится вещество – кинетохор, участвующее в формировании нитей веретена при клеточном делении.

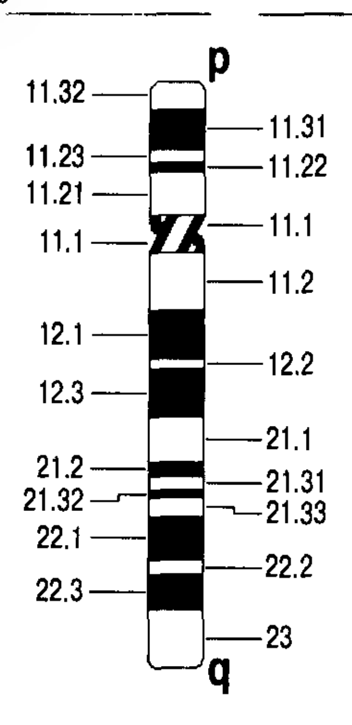


Рис. 19.4. Строение хромосомы человека

Основы существующей унифицированной классификации хромосом были заложены в 1960 г. в Денвере. В основу классификации положены различия в длине хромосом и расположении центромеры. На основании различий в длине выделены 23 пары хромосом, при этом парам, имеющим наибольшую длину, дан наименьший номер (самыми длинными являются хромосомы 1- и 2-й пары). Выделяют группы метацентрических, субметацентрических и акроцентрических хромосом. Отнесение хромосом к тому или иному типу производится на основе расчета **центромерного индекса** – отношения длины короткого плеча к длине всей хромосомы. В группе метацентрических хромосом короткое и длинное плечи приблизительно равны, и центромерный индекс приближается к 0,5. В субметацентрических хромосомах центромерный индекс снижен и составляет от 0,25 до 0,35, в акроцентрических хромосомах он часто не превышает 0,2. На основании комбинации этих двух основных признаков хромосомы сгруппированы в 7 групп, обозначаемых буквами английского алфавита (от A до G).

Группа A включает хромосомы 1, 2, 3, причем хромосомы 1 и 3 – метацентрики (центромерный индекс первой хромосомы равен 0,48–0,49, третьей – 0,45–0,46), а хромосома 2 – самый большой субметацентрик (с центромерным индексом 0,38–0,40).

Группа B состоит из двух хромосом – 4 и 5. Это большие субметацентрические хромосомы с центромерным индексом от 0,24 до 0,30.

Группа C включает семь аутосом (с 6 по 12) и половую X-хромосому. Это метацентрические и субметацентрические хромосомы среднего размера (0,28–0,43).

Группа D включает три акроцентрические хромосомы среднего размера: 13, 14 и 15. Их центромерный индекс не превышает 0,15 и является наименьшим в кариотипе человека. Для хромосом этой группы характерна значительная межиндивидуальная вариабельность и наличие спутников на коротких плечах. Длина проксимальных участков коротких плеч и спутничных нитей варьирует.

Группа E также включает три хромосомы – с 16 по 18. Это относительно короткие метацентрики и субметацентрики, с центромерным индексом 0,26–0,40.

Группа F состоит из двух небольших метацентрических хромосом (19 и 20) с центромерным индексом 0,36–0,46.

Группа G состоит из двух аутосом (21 и 22) и Y-хромосомы. Эти хромосомы имеют небольшой размер и относятся к акроцентрическим с центромерным индексом в пределах 0,13–0,33. Для аутосом этой группы характерно наличие спутников на коротких плечах.

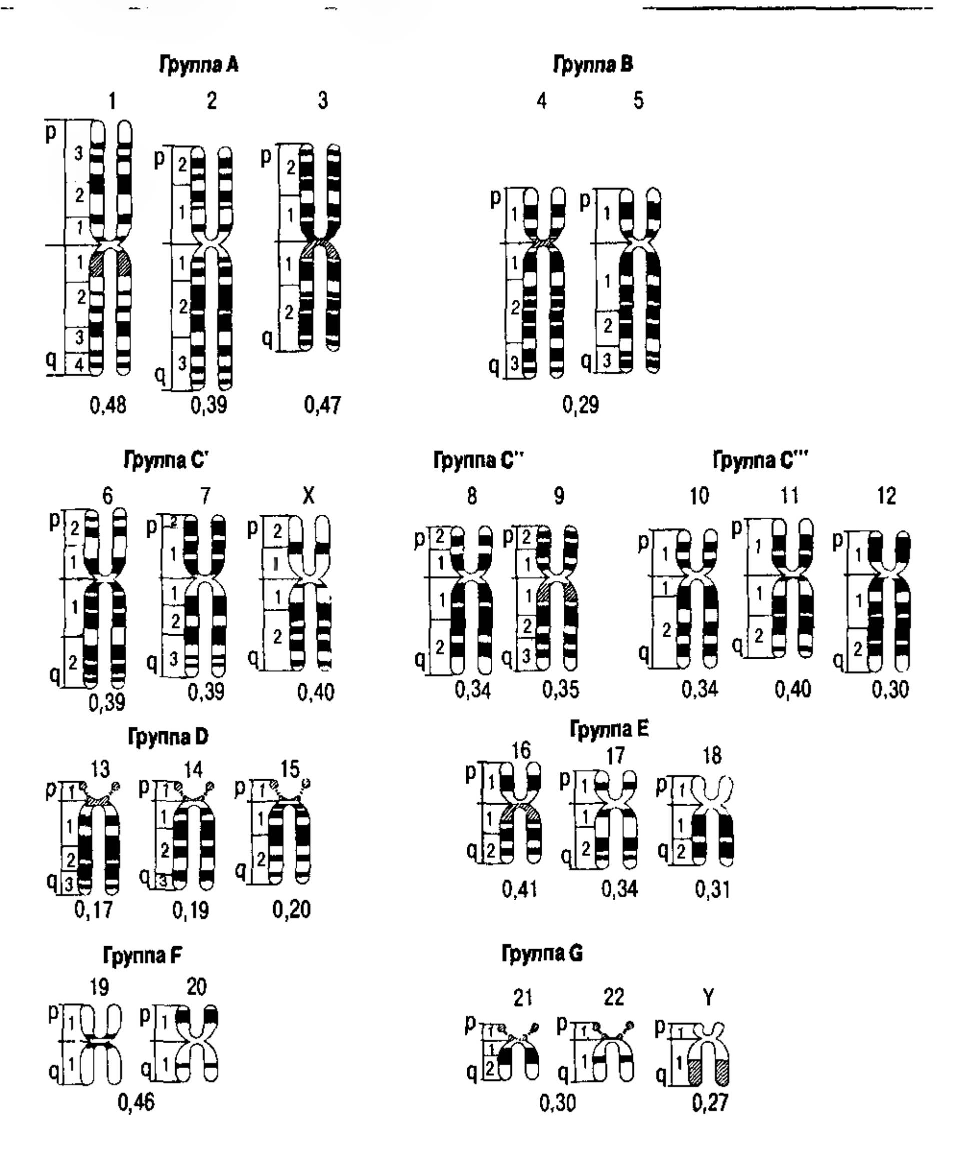


Рис. 19.5. Хромосомы человека (группы, схема сегментации, центромерный индекс)

В настоящее время Денверская номенклатура постепенно вытесняется более детальной классификацией, основанной на результатах исследования хромосом молекулярно-цитогенетическими методами.

Расположение хромосом по группам и схема их сегментации (расположение полос поперечной исчерченности при дифференциальном окрашивании) в соответствии с номенклатурой ISCN-1995 представлены на рис. 19.5.

19.4.1.2. ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД

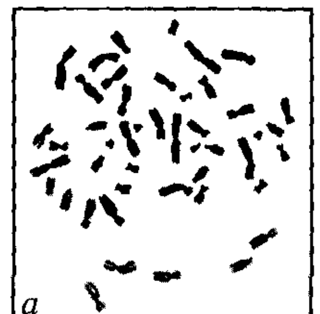
Анализ кариотипа человека проводят в культуре делящихся соматических и половых клеток. Наиболее часто при цитогенетических исследованиях в медицинской генетике используют культуру клеток периферической крови, прежде всего лимфоцитов, костного мозга и фибробластов. Наиболее доступны для исследований лимфоциты периферической крови, которые, в большинстве случаев и служат объектом цитогенетического анализа у человека в постнатальном периоде. Для анализа кариотипа плода могут быть использованы различные клеточные культуры; их выбор диктуется сроком беременности, в котором проводится исследование. Так, на раннем сроке (до 12 недель внутриутробного развития) анализ хромосом целесообразно проводить в клетках ворсин хориона, в то время как в более позднем сроке цитогенетическому исследованию подвергают клетки плода, выделенные из амниотической жидкости, пуповинной крови и плаценты (гл. 25).

Для исследования кариотипа человека достаточно получить образец периферической крови в количестве 1–2 мл. Цитогенетический анализ включает три основных этапа: 1) *культивирование клеток*; 2) *окраску препарата;* 3) *микроскопический анализ препарата*. Культивирование клеток проводится следующим образом. После забора образец крови помещают в питательную солевую среду с добавлением цельной сыворотки крупного рогатого скота и белка бобовых растений – фитогемагглютинина, стимулирующего процесс деления клеток. Успех цитогенетического исследования в значительной мере определяется тем, сколько клеток в культуре будут находиться в стадии метафазы. Для увеличения количества метафазных клеток за полтора часа до окончания культивирования в культуру вводят колхицин, который разрушает клеточное веретено, приостанавливает деление клеток на стадии метафазы и увеличивает конденсацию хромосом. Обычно, продолжительность культивирования составляет 72 ч. После его окончания клетки с питательной средой центрифугируют и помещают в гипотонический раствор хлорида калия или цитрата натрия. Гипотоническая обработка приводит к разрыву ядерной оболочки и межхромосомных связей и свободному перемещению хромосом в цитоплазме. После этого производится фиксация клеток смесью метанола и уксусной кислоты в соотношении 3:1, после чего клеточную суспензию раскапывают на охлажденные влажные предметные стекла и высушивают на воздухе.

На следующем этапе цитогенетического исследования производится окраска препаратов. В зависимости от целей исследования, то есть от того, какой именно тип перестроек необходимо выявить, можно использовать различные виды окрашивания.

Наиболее простой метод окрашивания хромосом, называемый в настоящее время *сплошным* или рутинным, применяют для определения количества хромосом в препарате и выявления геномных мутаций и анеуплоидий. При этой окраске используют краситель Гимзы, который равномерно прокрашивает хромосомы по всей длине, что дает возможность идентифицировать хромосомы и оценить их количество в препарате. Этот метод окраски успешно применялся до 70-х годов прошлого века и позволил выявить этиологию большинства хромосомных синдромов, характеризующихся изменением количества хромосом. В настоящее время сплошное окра-

шивание применяют, в основном, для выявления количественных аномалий кариотипа, а также специфического сайта ломкости при синдроме фрагильной X-хромосомы. Препарат метафазных хромосом человека, окрашенных по всей длине, представлен на рис. 19.6, *а*.



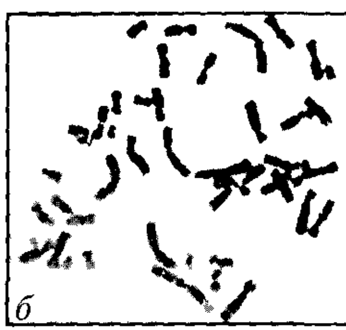


Рис. 19.6. Методы окраски хромосом человека.
а - рутинная окраска препарата метафазных хромосом;
б - препарат метафазных хромосом, окрашенных по G-методу (фотографии предоставлены В Г. Антоненко)

Однако использование рутинного метода окраски не позволяет выявлять структурные перестройки хромосом. В этих случаях применяют специальные методы, так называемой, дифференциальной окраски, в результате которой хромосомы приобретают поперечную исчерченность. Расположение и толщина темных и светлых полос строго индивидуальны для каждой хромосомы, что позволяет проводить их точную идентификацию и выявлять структурные перестройки. Для объяснения возникновения различно окрашенных полос на хромосомах выдвигается несколько гипотез: различия в количественном содержании А–Т- и G–С-пар оснований, особенности строения нуклеосом, а также асинхронность репликации различных участков ДНК.

Наибольшее распространение получил простой и эффективный *G-метод дифференциального окрашивания*. В этом случае для окрашивания хромосом также используют краситель Гимзы, однако, хромосомы предварительно обрабатывают раствором трипсина. Процедура окрашивания занимает от 5 до 10 минут и приводит к появлению специфичного для каждой хромосомы рисунка поперечной исчерченности. Показано, что количество полос в метафазных и прометафазных пластинках существенно различается: в метафазных пластинках их число достигает 400, а в прометафазных – от 800 до 1000. Препарат метафазных хромосом человека, окрашенных по G-методу, представлен на рис. 19.6, *б*.

Другие методы окраски используются реже вследствие их сложности или узкой специфичности. *R-метод* обусловливает сегментацию хромосом, противоположную той, которая имеет место при окраске G-методом.

С-метод дифференциальной окраски позволяет анализировать лишь некоторые районы хромосом – участки так называемого конститутивного гетерохроматина, локализованного в околоцентромерных областях длинных плеч хромосом 1, 9 и 16, в длинном плече Y-хромосомы, а также в коротких плечах акроцентрических хромосом.

Для дифференциальной окраски хромосом могут использоваться флуорохромы акрихин, акрихин-иприт, квинакрин и другие (*Q-метод* окраски). По результатам дифференциальной флуоресцентной окраски идентифицируют каждую пару гомологов, а по свечению Y-хроматина определяют наличие Y-хромосомы в интерфазном ядре.

Третий этап исследования кариотипа человека заключается в световом микроскопировании фиксированных и окрашенных препаратов метафазных хромосом. Для адекватного выявления хромосомных аномалий необходимо проанализировать не менее 30 метафазных пластинок. В том случае, если предполагается мозаицизм по хромосомным аномалиям, количество анализируемых хромосом должно быть увеличено. Число клеток (n) необходимых для анализа с целью определения заданного уровня мозаицизма можно определить по формуле биноминального распределения: $P = (1 - p)^n$, где p – заданный уровень мозаицизма, P – вероятность обнаружения мозаицизма. Учитывая, что в различных клетках организма количество нормальных и аномальных клонов может различаться, для выявления мозаицизма может потребоваться анализ нескольких тканей, например, клеток крови, фибробластов, половых желез.

19.4.1.3. МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД

В ряде случаев использование традиционного цитогенетического метода не позволяет идентифицировать все имеющиеся хромосомные перестройки, особенно если в них вовлечены более двух хромосом или они захватывают очень малый по размеру участок. Для этих целей в последние годы разработаны новые высокоинформативные молекулярно-цитогенетические методы, главный из которых *флуоресцентная гибридизация in situ*, или так называемый *FISH-метод* (от англ. *fluorescent in situ hybridization*). С помощью этого метода можно проводить гибридизацию метафазных или интерфазных хромосом с различными ДНК-зондами, меченными флуоресцирующими веществами (гл. 18). Зонды представляют собой клонированные последовательности или выделенные участки ДНК. Наиболее часто используют высокоповторяющиеся последовательности ДНК центромерных или перицетромерных районов, однако, в ряде случаев возникает необходимость в применении уникальных ДНК-последовательностей, таких как космидные клоны или анонимные последовательности. С их помощью удается не только идентифицировать различные типы структурных хромосомных перестроек, но и провести более тонкий генетический анализ (например, идентифицировать точки разрыва при транслокациях, инверсиях, делециях, а также структуру маркерных хромосом).

В некоторых случаях, особенно при возникновении сложных транслокаций с вовлечением нескольких хромосом, возникает необходимость использовать в процессе гибридизации большое число флуоресцирующих ДНК-зондов, которые иногда прокрашивают хромосому практически целиком. Такую модификацию FISH-метода называют *супрессорной гибридизацией*. Для успешного осуществления этих методов созданы специальные библиотеки хромосомоспецифичных участков ДНК. В последние годы при проведении FISH-анализа все чаще используют ДНК-зонды, меченные различными цветами. Применение разноцветных зондов позволяет более быстро и эффективно провести анализ количественных и структурных перестроек хромосом, особенно, в случае пренатальной экспресс-диагностики.

19.4.1.4. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ НОРМАЛЬНОГО КАРИОТИПА ЧЕЛОВЕКА

Для описания нормального кариотипа человека, а также для обозначения структурных и количественных перестроек хромосом используется определенная универсальная схема и специальные символы. Описание кариотипа начинают с указания общего количества хромосом в клетке, после чего ставится запятая и обозначается набор половых хромосом, указывающий на пол обследованного. Например, запись 46,XX характеризует нормальный кариотип женщины, а 46,XY – нормальный кариотип мужчины. Если хромосомных перестроек у обследованного не выявлено, то запись на этом заканчивается. В ряде случаев, при обследовании обнаруживают, так называемый, нормальный полиморфизм хромосом – индивидуальные особенности их строения. Полиморфизм наиболее характерен для акроцентрических хромосом и, как правило, отражает вариабельность размеров гетерохроматиновых сегментов, наличие спутников и спутничных нитей в области коротких плеч и их величину (рис. 19.7). Иногда в качестве вариантов нормального кариотипа рассматривают наличие ломких сайтов хромосом, часто выявляемых при культивировании в определенной среде. В большинстве случаев наличие полиморфизма строения хромосом не приводит к возникновению патологических симптомов у их обладателя. Отсутствие патологических последствий при увеличении размеров гетерохроматиновых блоков хромосом можно объяснить особенностью строения гетерохроматина. Показано, что в его структуру входит ДНК с многократно повторяющимися последовательностями, количественные изменения которой не приводят к существенному генному дисбалансу. Кроме того, считается, что некодирующая саттелитная ДНК гетерохроматиновых районов некоторых хромосом может способствовать повышению уровня функционирования генома.

Необходимо отметить, что иногда наличие нормального полиморфизма хромосом, все-таки увеличивает риск рождения ребенка с хромосомными аномалиями.

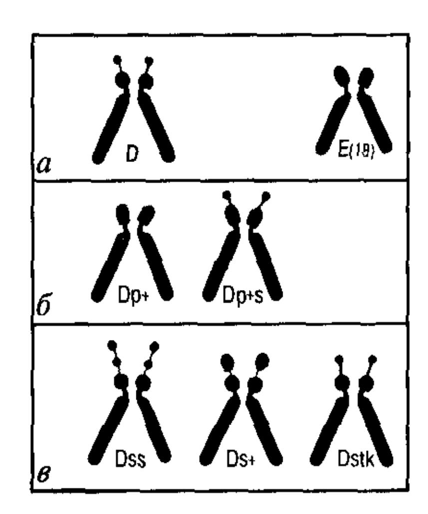


Рис. 19.7. Нормальный полиморфизм акроцентрических хромосом (группа D или G) человека.(Из: Фогель Ф., Мотульски А., 1989)

а – нормальные хромосомы из групп D и E (18-хромосома);

б – Dp+ – удлиненные короткие плечи хромосомы из группы D (их длина такая же как у хромосомы 18);

Dp+s – на удлиненных коротких плечах расположены спутники нормальных размеров;

в – D-хромосомы со структурными вариантами спутничного района:

ss – двойные спутники; s+ - увеличенные спутники; s*tk* – удлиненные спутничные нити

Таблица 19.2. **Обозначение полиморфизма хромосом человека**

Символы кариотипа	*Тип хромосомной перестройки*
46,XX,9qh+	Увеличение размера гетерохроматинового участка в длинном плече хромосомы 9 женщины
46,XY,Yqh–	Уменьшение размера гетерохроматинового района на длинном плече Y хромосомы мужчины
46,XX,22ps+	Увеличение размера спутников на коротком плече хромосомы 22 у женщины
46,XY,21pstk	Увеличение длины спутничных нитей на коротком плече хромосомы 21 у мужчины
46,XX,fra(16) (q21.3)	Ломкий сайт в сегменте 21 длинного плеча хромосомы 16
46,XX,15pss	Появление двойных спутников на коротком плече хромосомы 15 у женщины
46,XX,21ps+	Увеличение размера спутников на коротком плече хромосомы 21 у женщины

Существуют данные, свидетельствующие о том, что среди супружеских пар, у которых наблюдалось рождение детей с пороками развития, а также страдающих бесплодием и привычным невынашиванием беременности, статистически значимо чаще выявляется носительство хромосом с крупными гетерохроматиновыми блоками. Преобладание лиц с увеличенными в размере гетерохроматиновыми сегментами в акроцентрических хромосомах, а также хромосомах 1, 9 и 16, отмечено в группе детей с множественными врожденными пороками развития невыясненной этиологии и олигофренией.

Обозначения основных вариантов полиморфизма нормального кариотипа человека представлены в табл. 19.2.

Достаточно часто в популяции здоровых людей при цитогенетическом анализе выявляется заметное увеличение коротких плеч некоторых хромосом (например, хромосомы 15). Изучение нормального полиморфизма хромосом может иметь значение для определения родительского происхождения хромосомной перестройки. Если установлено, от кого из родителей унаследован полиморфизм хромосом, то это указывается при записи кариотипа. Например, запись 46,XX,15ps+pat означает, что женщиной от отца унаследованы увеличенные спутники на хромосоме 15, а запись 46,XY,16 qh+ mat указывает на материнское наследование увеличенного в размере гетерохроматина хромосомы 16.

19.4.2. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Характерные изменения биохимических показателей, выявляемые при той или иной наследственной патологии, служат постоянным, а иногда и единственным признаком заболевания. Кроме того, отклонения в биохимических параметрах, как правило, предшествуют возникновению клинических симптомов, и существенно не зави-

сят от клинико-генетического полиморфизма, обусловливающего вариабельность заболевания по степени тяжести и времени начала манифестации. Таким образом, биохимические параметры можно считать наиболее информативным описанием фенотипа. Подтверждением этого являются биохимические показатели гетерозигот, значения которых часто занимают промежуточное положение между значениями у нормальных и патологических гомозигот: например, гетерозиготные носители рецессивного аллеля фенилкетонурии симптомов заболевания не имеют, но реагируют на введение фенилаланина более сильным повышением концентрации этой аминокислоты в плазме, чем нормальные гомозиготы. К тому же не для всех наследственных заболеваний обнаружен молекулярно-генетический дефект или имеются возможности для его выявления. В связи с этим, биохимические методы играют важнейшую роль в диагностике наследственных заболеваний, позволяя подтверждать диагноз в случае атипичной клинической картины, проводить доклиническую диагностику и начинать лечение на ранних стадиях заболевания, выявлять гетерозиготных носителей, дифференцировать генетически различные формы болезни со сходной клинической картиной. Результаты диагностики гетерозиготного носительства биохимическими методами могут быть использованы в практике медико-генетического консультирования при расчетах риска рождения ребенка с наследственным заболеванием на основе вероятностных подходов.

Предметом биохимической диагностики могут быть различные классы органических и неорганических веществ (аминокислоты, углеводы, липиды, мукополисахариды, ионы металлов и др.) и их метаболиты, концентрация и отклонения в активности ферментов. Универсальность биохимической диагностики состоит в том, что исследовать этими методами можно любую ткань или секрет организма (мочу, пот, кровь, слюну, мышцы и др.). Это обусловливает многообразие биохимических методов и необходимость их непрерывного совершенствования.

Безусловно, биохимические методы играют первоочередную роль в диагностике наследственных нарушений обмена веществ (НБО). Универсальность этих методов позволяет использовать их в дифференциальной диагностике и для выявления гетерозиготного носительства другой моногенной патологии, при которой изменение биохимических показателей является вторичным: например, при прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшенна/Бекера (ПМДД/Б) повышается уровень креатинфосфокиназы (фермент мышц) в крови больных при начальной и развернутой стадии заболевания, а также и у 30% носительниц гена ПМДД/Б.

Для диагностики ряда состояний используют комбинированные биохимические методы. Так иммуно-генетическое тестирование позволяет поставить или уточнить диагноз при врожденных иммунодефицитных состояниях, при подозрении на антигенную несовместимость матери и плода по тем или иным системам групп крови. *Иммуно-гистохимический* метод используется для выявления той или иной белковой субстанции в какой-либо ткани при помощи специфичных антител (именно так проводят дифференциальную диагностику поясно-конечностных прогрессирующих мышечных дистрофий и ПМДД/Б: исследуют мышечные волокна на наличие или отсутствие в них дистрофина при помощи антител, специфичных для С-домена, Rod-домена и N-конца белка дистрофина).

С каждым годом совершенствуясь, биохимические методы становятся все более сложными, многоступенчатыми, а, следовательно, и дорогими. Использовать их для

программ массового скрининга наследственных болезней, многие из которых встречаются в популяциях с сравнительно низкой частотой, невыгодно. Необходимо предварительное «просеивание» популяции (гл. 25).

Биохимические методы подразделяют на качественные, количественные и полуколичественные.

Качественные реакции позволяют обнаружить избыточные концентрации субстратов блокированной ферментной реакции или их производных, накапливающихся при НБО. Качественные тесты чувствительны, просты в применении, отличаются низкой себестоимостью и не дают ложноотрицательных результатов, а информация, полученная с их помощью, позволяет с высокой долей вероятности заподозрить НБО у пациента. Однако на результаты этих тестов влияет применение ряда лекарственных препаратов и их метаболитов, а также некоторых пищевых добавок. Качественные пробы бывают: универсальными (выделяется группа заболеваний, класс веществ; например, ЦПХ-тест для мукополисахаридов) и специфическими (на цистин-гомоцистин, метилмалоновую кислоту и др.). Наиболее распространены качественные тесты с мочой, вследствие доступности и простоты получения материала для исследования. Основные используемые для диагностики НБО качественные тесты с мочой представлены в табл. 19.3.

Таблица 19.3. **Качественные тесты с мочой**

Тест	Диагностируемые НБО	Другие состояния, имеющие положительные результаты теста
Органолептические (цвет, запах)	3-Гидрокси-3-метилглутаровая ацидурия, алкаптонурия, изовалериановая ацидемия, лейциноз, тирозинемия, ФКУ, цистинурия	–
Тест Бенедикта	Алкаптонурия, врожденная непереносимость фруктозы, галактоземия, лактазная недостаточность	Диабет, синдром Фанкони, прием антибиотиков
Тест с хлоридом железа	Алкаптонурия, гиперглицинемия, гистидинемия, лейциноз, тирозинемия, ФКУ	Гипербиллирубинемия; кетоацидоз, лактат-ацидоз; карциноматоз; меланома; феохромацитома; цирроз
Тест с динитрофенилгидразином	Алкаптонурия, гиперглицинемия, гликогенозы, лейциноз, ФКУ	Лактат-ацидоз
Тест с р-нитроанилином	Метилмалоновая ацидурия	–
Сульфитный тест	Недостаточность молибденового кофактора	–
Тест на гомогентизиновую кислоту	Алкаптонурия	–
Тест с нитрозонафтолом	Тирозинемия, галактоземии и фруктоземии	–

Таблица 19.4. Классы веществ, выявляемые различными методами анализа

Методы анализа		Анализируемые классы веществ
ТСХ	Двумерная	Аминокислоты; имидазолы; моно- и дисахариды; пурины и пиримидины; фенольные кислоты
	Одномерная	Аминокислоты; моно- и дисахариды; олигосахариды; сиаловые кислоты
ВЭЖХ		Аминокислоты; пурины и пиримидины
ХМС		Органические кислоты; ОДЦЖК; холестерин; желчные кислоты
Тандемная масс-спектрометрия (ТМС)		Аминокислоты; ацилкарнитины
Электрофорез гликозаминогликанов		Гликозаминогликаны

Полуколичественные и количественные тесты проводятся как с мочой (тест с циа-нид-нитропруссидом – гомоцистинурия, цистинурия; ЦПХ-тест – мукополисахаридозы), так и с кровью (газы крови, глюкоза, ионы аммония, молочная кислота, кетоновые тела, пировиноградная кислота, холестерин, триглицериды) и могут иметь различную степень сложности. Наиболее простые из них, такие как измерение концентрации лактата, пирувата, кетоновых тел, ионов аммония, а также определение кислотно-щелочного равновесия, позволяют планировать дальнейшую тактику диагностики: так метаболический ацидоз служит показанием для проведения газовой хроматографии (ХМС) с целью исключения органических ацидурий, а повышение концентрации ионов аммония – для исключения дефектов цикла мочевины; определение концентрации кетоновых тел и соотношения концентраций лактат/пируват в крови является первым этапом для дифференциальной диагностики митохондриальных болезней.

Конечно, решающее значение в диагностике нарушений обмена играют более сложные и высокоточные количественные методы, такие как флуориметрические, хроматомасс-спектрометрия, спектрофотометрия, различные виды хроматографии и электрофорез гликозаминогликанов (ГАГ). Все эти методы можно условно разделить на две группы: методы позволяющие получить спектр какого-либо класса веществ, например аминокислот, и методы для определения концентрации конкретного вещества, например фенилаланина или тирозина (флуориметрический метод). Хроматографические методы, как правило, дают информацию о спектре и количестве веществ (табл. 19.4).

Тонкослойная, колоночная и др. виды хроматографии применяются для выделения и очистки анализируемых соединений, а также для получения результатов на полуколичественном уровне. Так, тонкослойную хроматографию используют для выявления дефектов обмена пуринов и пиримидинов, углеводов, аминокислот, олигосахаридов и гликозаминогликанов (мукополисахаридов). Метод не требует специального дорогостоящего оборудования, интерпретация результатов довольно проста, а стоимость одного анализа невысока, что иногда позволяет использовать этот метод и на первом этапе скрининга (гл. 25). Более того, поскольку тонкослойная хромато

Таблица 19.5. **Диагностика наследственных болезней обмена с помощью различных методов анализа**

Класс НБО	Определяемые метаболиты	Метод анализа
Аминоацидопатии	Аминокислоты, птеридины*	Аминокислотный анализатор, ВЭЖХ, ТМС
Митохондриальные болезни	Лактат, пируват, 3-гидроксибутират, ацетоацетат	ВЭЖХ
Органические ацидурии	Органические кислоты	ХМС, ВЭЖХ, ТМС
Болезни пуринового и пиримидинового обмена	Пурины, пиримидины, мочевая кислота	ВЭЖХ
Болезни углеводного обмена	Моно- и дисахариды	ВЭЖХ
Лизосомные болезни	Олигосахариды	ВЭЖХ
Болезни нарушения митохондриального β-окисления	Карнитин и его эфиры, разветвленные и неразветвленные дикарбоновые кислоты от С6 до С14	ВЭЖХ, ХМС, ТМС
Пероксисомные болезни	ОДЦЖК, фитановая кислота, желчные кислоты, плазмалогены, пипеколиновая кислота	ГХ, ХМС, ВЭЖХ
Болезни обмена металлов	Ионы металлов, сульфатов, аминокислот	ВЭЖХ
Наследственные болезни метаболитного транспорта	Сиаловые кислоты, хлориды, сахара	ВЭЖХ
Наследственные болезни желудочно-кишечного тракта	Моно- и дисахариды	ВЭЖХ
Болезни холестеринового обмена	Холестерин и его производные, триацилглицериды	ГХ, ХМС
Болезни нейротрансмиттерного обмена	Катехоламины, аминокислоты	ВЭЖХ
Болезни обмена гема и порфиринов	Порфирины	ВЭЖХ
Наследственные эндокринопатии	Стероидные и тиреоидные гормоны	ВЭЖХ

* – при злокачественной ФКУ, используется только ВЭЖХ.

ГХ – газовая хроматография; ХМС – хроматомасс-спектрометрия; ТМС – тандемная масс-спектрометрия

Определение уровня ОДЦЖК включает в себя следующие этапы. внесение в пробу внутреннего стандарта (метилового эфира кислоты С27); выделение липидной фракции; этерификация жирных кислот в соответствующие метиловые эфиры; выделение последних препаративной тонкослойной хроматографией и анализ полученной фракции на газовом хроматографе.

графия в зависимости от класса используемой аппаратуры может быть качественной, полуколичественной и количественной, она может применяться на разных этапах скрининга.

Наиболее точным, но сложным и обладающим малой пропускной способностью (2 анализа в сутки) методом является ионообменная жидкостная хроматография с использованием аминокислотного анализатора.

Метод высоковольтного электрофореза с последующей нисходящей хроматографией аминокислот на бумаге дает ту же информацию, но отличается высокой пропускной способностью (30–40 проб в сутки), дешевле, чем ТСХ, но менее чувствителен.

В последние годы все большее значение приобретают высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и хроматомасс-спектрометрия (ХМС).

ХМС – комбинированный метод хроматографии и масс-спектрометрии. Он позволяет получать как количественную, так и качественную информацию, например, определять какие вещества, с какой молекулярной массой, присутствуют в анализируемой пробе и в каком количестве. Кроме того, с помощью ХМС можно получить количественную информацию о неразделенных или совместно элюируемых соединениях, что является одним из важных преимуществ этого метода.

Тандемная масс-спектрометрия (ТМС) – метод, с помощью которого можно количественно оценить 3000 метаболических маркеров разных групп НБО одновременно и охарактеризовать классы веществ и их молекулярную массу. При этом времени для подготовки проб и проведения анализа затрачивается существенно меньше, чем при использовании некоторых выше перечисленных методов, например, при ГХ.

Таким образом, совершенствование методов биохимической диагностики позволяет выявлять и подтверждать все большее количество нарушений обмена веществ. Классы НБО, диагностируемые с применением различных биохимических методов анализа, представлены в табл. 19.5.

19.4.3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

Наиболее адекватные методы, обеспечивающие точную диагностику моногенных заболеваний, основаны на исследовании ДНК в районе определенных генов. Несмотря на то, что молекулярно-генетические методы, как правило, весьма сложны, трудоемки и дорогостоящи, данные, полученные в процессе ДНК-диагностики намного точнее и информативнее данных других анализов. Известно, что ДНК остается неизменной на протяжении всей жизни организма и одинакова во всех ядерных клетках, что позволяет использовать для анализа практически любые клетки организма, полученные на разных стадиях онтогенеза. Кроме того, с помощью ДНК-анализа поврежденный ген можно обнаружить не только при наличии развернутой клинической картины заболевания, но и до появления симптомов, а также у здоровых гетерозиготных носителей мутации в гене.

Предметом ДНК-диагностики может быть как исследование гена с целью выявления мутаций (***прямой подход ДНК-диагностики***), так и анализ сегрегации заболева-

ния в определенной семье с полиморфными участками ДНК (маркерными локусами), тесно сцепленными с поврежденным геном (*косвенный подход ДНК-диагностики*). Прямая и косвенная ДНК-диагностика основана на методах, позволяющих идентифицировать небольшой, но строго определенный фрагмент ДНК человека. Обычно для этого используют блот-гибридизацию либо амплификацию с последующим анализом полученных образцов ДНК при помощи электрофореза в агарозном или полиакриламидном гелях или радиоавтографии (гл. 18).

Прямые методы ДНК-диагностики используются в тех случаях, когда известен ген, ответственный за возникновение наследственного заболевания и основные типы его патологических мутаций. Использование прямых методов ДНК-диагностики целесообразно для таких заболеваний как муковисцидоз (мажорная мутация delF508), фенилкетонурия (R408W), хорея Гентингтона (экспансия CTG-повторов) и ряда других.

Главное преимущество прямого метода – это высокая, практически 100%, точность диагностики и отсутствие необходимости ДНК-анализа всех членов ядерной семьи. Обнаружение мутации в соответствующем гене позволяет абсолютно точно подтвердить диагноз наследственного заболевания и определить генотип всех членов отягощенной семьи. Еще одно достоинство прямой диагностики – возможность выявления гетерозиготного носительства патологических мутаций у родителей умершего больного и его родственников, что особенно актуально для аутосомно-рецессивных заболеваний.

Основной недостаток прямых методов состоит в том, что для их применения требуется знание точной локализации патологического гена в геноме, его экзон-интронной структуры и спектра его мутаций. Такая информация на сегодняшний день доступна далеко не для всех моногенных болезней человека.

К недостаткам прямых методов следует также отнести их неполную информативность, что связано с наличием широкого спектра патологических мутаций в одном и том же гене, обусловливающих развитие наследственного заболевания. В зависимости от объема спектра мутаций в определенном гене, эта информативность может широко варьировать. Часть семей в этом случае остается неинформативной для ди-

Таблица 19.6. **Информативность прямых методов ДНК-диагностики для различных заболеваний**

Заболевание	Информативность прямой диагностики
Ахондроплазия	100%
Хорея Гентингтона	100%
Спинальная амиотрофия	98%
Невральная амиотрофия Шарко–Мари–Тута	97%
Атаксия Фридрейха	93%
Фенилкетонурия	80%
Адреногенитальный синдром	78%
Муковисцидоз	72%
Миодистрофия Дюшенна/Бекера	60%
Болезнь Вильсона–Коновалова	45%

агностики. Табл. 19.6 дает представление об информативности прямых методов для различных заболеваний.

Косвенные методы ДНК-диагностики применяют в том случае, если ген, повреждение в котором приводит к заболеванию, не идентифицирован, а лишь локализован на определенной хромосоме, или когда методы прямой ДНК-диагностики не дают результата, (например, при значительной протяженности и сложной молекулярной организации гена, а также широком спектре патологических мутаций в нем). Косвенные методы ДНК-диагностики основаны на анализе сегрегации в семье аллелей полиморфных маркеров, находящихся в том же хромосомном регионе или тесно сцепленных с локусом заболевания. Полиморфные маркеры, используемые для косвенной ДНК-диагностики, представляют собой точковые замены, делеции/инсерции, повторы, полиморфизм которых обусловлен различным количеством элементов в блоке.

Наиболее удобными для косвенной ДНК-диагностики признаны микросателлитные (мономер до 5 п.н.) и минисателлитные (мономер повтора состоит из 5 60 п.н.) полиморфные маркеры, широко распространенные в геноме человека. Для абсолютного большинства известных в настоящее время полиморфных сайтов такого типа был строго показан менделевский характер наследования. Наиболее типичными среди микросателлитов являются динуклеотидные повторы, а самым распространенным из них – «CA»-повтор. Показано, что кластеры «CA»-повторов встречаются в геноме в среднем каждые 30 тысяч нуклеотидных пар. Во многих кластерах присутствует от 10 до 30 динуклеотидных повторов и типичное количество аллелей составляет 4–8, что обеспечивает высокую информативность маркера.

Для количественной оценки информативности данного маркера введена величина, получившая название информационного содержания полиморфизма (PIC – от англ. *polimorphism information content*), которая вычисляется по следующей формуле:

$$PIC = 1 - \Sigma P_i^2 - \Sigma\Sigma P_i^2 P_j^2; \quad \text{где } P_i \text{ – частота i-го аллеля}$$

Эта величина определяет вероятность того, что изучение генотипа ребенка из исследуемой семьи и его родителей с помощью полиморфного маркера позволит определить: с каким из аллелей в данной семье сцеплено повреждение.

Ценность полиморфного маркера для ДНК-диагностики зависит не только от его информативности, но и генетического расстояния между маркером и повреждением в гене, так как точность оценки генетического риска в значительной степени определяется частотой рекомбинации между сайтом повреждения и полиморфным локусом.

Применение косвенных методов молекулярной диагностики предусматривает также в качестве обязательного предварительного этапа исследование частоты аллелей соответствующих полиморфных сайтов в анализируемых популяциях, среди больных и гетерозиготных носителей мутаций, а также определение вероятности рекомбинации и неравновесия по сцеплению между маркерными сайтами и мутантными аллелями гена.

Таким образом, основной недостаток косвенных методов заключается в их не 100%-ной точности. Действительно, возможная ошибка обусловлена вероятными

рекомбинациями между изучаемым полиморфным локусом и повреждением в гене, а величина этой ошибки определяется двумя факторами: генетическим расстоянием между полиморфным локусом и мутацией, приводящей к заболеванию, и генетическим размером самого гена. Очевидно, что для уменьшения ошибки необходимо использовать маркеры расположенные непосредственно вблизи гена или даже внутри него. Однако, часто размер критической области локализации гена составляет несколько сантиморганид, кроме того существуют гены, имеющие генетический размер 3 -5 сантиморганид (например ген дистрофина). Для таких генов даже при использовании внутригенных маркеров величина ошибки составит 2 -3% на мейоз. С возрастанием числа анализируемых мейозов ошибка будет накапливаться. Вообще, точный расчет генетического риска при проведении косвенной диагностики представляет собой довольно сложную математическую задачу. Типичная ошибка при проведении косвенной диагностики составляет 1—5%.

К недостаткам косвенной диагностики следует отнести необходимость семейного анализа и обязательную уверенность в клиническом диагнозе, так как ни подтвердить, ни опровергнуть его при использовании этих методов (в отличие от прямых) невозможно. Кроме того, косвенные методы ДНК-диагностики могут быть применены только для монолокусных заболеваний и неэффективны для моногенных полилокусных болезней. Действительно, для таких заболеваний существует несколько локусов, в которых необходимо проводить сегрегационный анализ и не ясно, какой из локусов выбрать.

Косвенные методы не требуют знания структуры гена и спектра мутаций в нем. Необходимо только иметь сведения о его локализации. В этом состоит основное преимущество этих методов. Кроме того, методы косвенной диагностики информативны практически для всех обратившихся семей, поскольку всегда есть возможность среди полиморфных маркеров, сцепленных с локусом заболевания, найти информативный для данной семьи.

Золотой стандарт ДНК-диагностики на сегодняшний день – комплексное использование и прямых и косвенных методов в каждом конкретном случае: подтверждение результатов косвенной диагностики результатами прямой, и наоборот. Такой подход позволяет получить наиболее точный и адекватный результат.

глава 20

ХРОМОСОМНЫЕ АНОМАЛИИ И ОБУСЛОВЛЕННЫЕ ИМИ СИНДРОМЫ

Хромосомные синдромы — большая группа патологических состояний, возникающих в результате аномалии количества и/или структуры хромосом человека. Клинические проявления при хромосомных нарушениях наблюдаются с рождения и не имеют прогредиентного течения, поэтому, правильнее называть эти состояния синдромами, а не заболеваниями. В отличие от синдромов наследственные болезни характеризуются варьирующим возрастом начала и стадийностью течения, в процессе которого симптомы нарастают или модифицируются таким образом, что клиническая картина в начале и терминальной стадии может существенно различаться. Частота хромосомных синдромов составляет 5 7 на 1000 новорожденных. Однако эти показатели могли бы быть значительно выше, если бы всем эмбрионам с хромосомными перестройками удавалось пройти полный цикл внутриутробного развития и родиться. Аномалии хромосом достаточно часто возникают, как в половых, так и в соматических клетках человека. Предполагается, что около 50% всех спонтанных абортов обусловлены наличием хромосомных перестроек у плода. Около 30% оплодотворенных яйцеклеток погибает в предимплантационный период (первые 10 дней после оплодотворения) в связи с наличием хромосомных аномалий, которые нарушают координированную работу генов, экспрессирующихся в раннем эмбриогенезе. В первом триместре беременности половина всех случаев самопроизвольного прерывания беременности связана с хромосомными перестройками у эмбриона. Во втором триместре хромосомные перестройки являются причиной самопроизвольных абортов в 25% случаев. Гибель плода после 20 недель развития лишь в 10% случаев оказывается результатом хромосомной аномалии. Вероятность прерывания беременности и внутриутробной гибели плода зависит от номера хромосомы, вовлеченной в перестройку и типа аномалии. Так моносомии по аутосомам, как правило, обладают летальным эффектом. Достаточно редко у живорожденных выявляются структурные перестройки хромосом 1, 2, 3. Наиболее жизнеспособны дети с аномалиями акроцентрических хромосом (13–15 и 21–22).

20.1. КЛАССИФИКАЦИЯ ХРОМОСОМНЫХ АНОМАЛИЙ У ЧЕЛОВЕКА

В группе хромосомных аномалий принято выделять **геномные** и **хромосомные мутации**. **Геномные мутации** характеризуются увеличением полного набора хромосом

(*полиплоидии*) или изменением количества хромосом по одной из пар (*анеуплоидии*). У человека описано два вида полиплоидий – триплоидии и тетраплоидии, характеризующиеся соответственно трех- и четырехкратным увеличением числа гаплоидных наборов хромосом. Анеуплоидии могут выражаться и в увеличении числа хромосом одной пары (трисомии и тетрасосомии), и в их уменьшении (моносомии). Полиплоидии, как правило, не совместимы с жизнью и встречаются у абортусов и мертворожденных. Летальным эффектом во внутриутробном периоде обладают и моносомии по всем аутосомам. Наиболее частые геномные мутации у живорожденных – это трисомии по аутосомам и половым хромосомам и моносомии по Х-хромосоме. Существует два основных механизма возникновения анеуплоидий:

1) неправильное расхождение гомологичных хромосом в мейозе, в результате чего в одну половую клетку попадают две хромосомы (это приводит к возникновению трисомной зиготы), а в другую ни одной (зигота окажется моносомной);

2) неправильное расхождение гомологичных хромосом в процессе конъюгации. К нарушению конъюгации хромосом могут приводить некоторые структурные хромосомные перестройки, например, пара- и перицентрические инверсии, а также увеличение размеров гетерохроматиновых участков хромосом.

Хромосомные мутации обусловливают различные изменения структуры хромосом. Хромосомные мутации характеризуются значительным разнообразием и могут затрагивать одну или две хромосомы одной или нескольких пар. Наиболее часто в межхромосомные перестройки вовлекаются две различные пары хромосом, однако, в редких случаях в хромосомной перестройке могут участвовать несколько пар хромосом.

20.1.1. ХАРАКТЕРИСТИКА ВНУТРИ- И МЕЖХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК

Необходимое условие возникновения внутрихромосомной структурной перестройки – наличие двух точек разрыва в одном или обоих плечах одной и той же хромосомы. Внутрихромосомными могут быть делеции, дупликации, транслокации и инверсии. Именно эти типы внутрихромосомных перестроек выявляются при разных видах патологии человека.

Для образования межхромосомных перестроек, также как и внутрихромосомных, необходимы две точки разрыва. Однако разрывы должны произойти в обеих хромосомах одной пары или в двух хромосомах из разных пар. К межхромосомным перестройкам относятся транслокации и инсерции (вставки участка хромосомы в несвойственное ему место). Подробно механизмы образования основных типов внутри- и межхромосомных перестроек рассмотрены в гл. 13.

Основные межхромосомными перестройками являются транслокации. Выделяют реципрокные и робертсоновские транслокации.

Реципрокные транслокации – это сбалансированные хромосомные перестройки, при которых весь генетический материал сохраняется, а изменения касаются только расположения генов в хромосомах. Механизм реципрокных транслокаций описан в гл. 13 и представлен на рис. 13.8. У носителей таких транслокаций обычно нет каких-

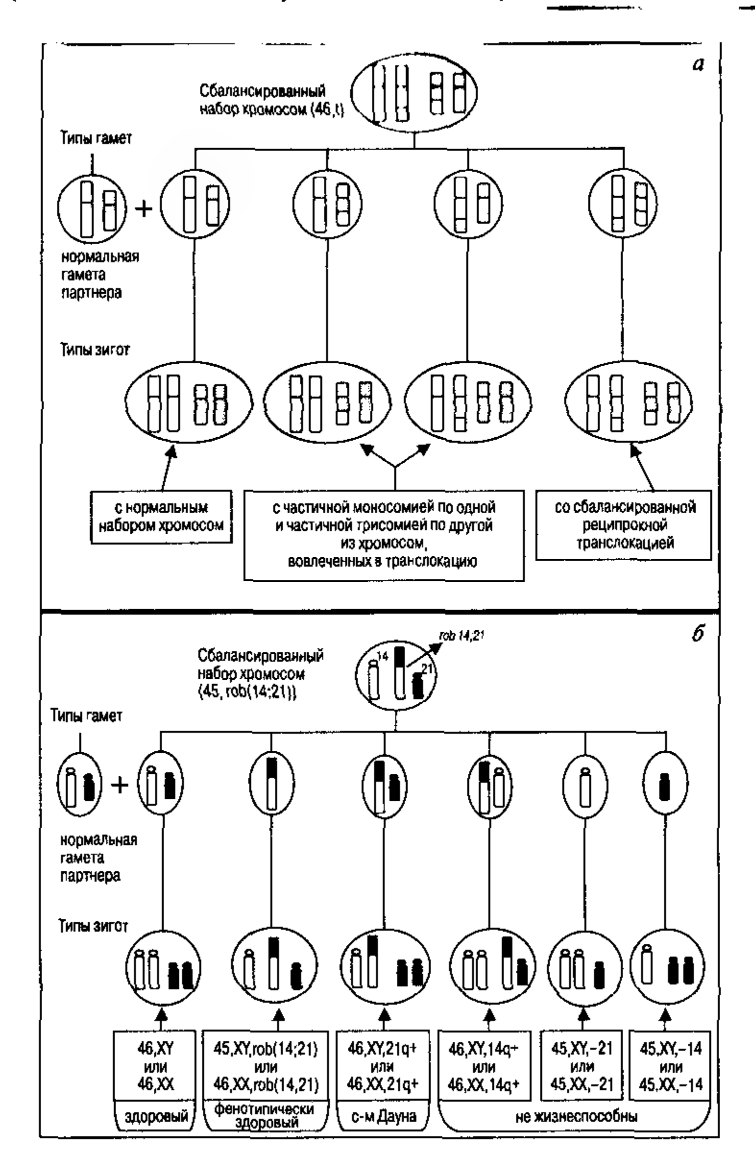


Рис. 20.1. Типы гамет у носителей транслокаций

а – типы гамет у носителя реципрокной транслокаци; у фенотипически здорового носителя сбалансированной реципрокной транслокации может быть 4 типа гамет и, соответственно, ожидаются потомки: 1) с нормальными фенотипом и генотипом; 2) и 3) - с синдромами, обусловленными частичной моносомией и частичной трисомией соответствующих вовлеченных в транслокацию хромосом; 4) с нормальным фенотипом, но, как и их родитель, являющиеся носителями реципрокной сбалансированной транслокации; б - типы гамет у носителя робертсоновской транслокации; у фенотипически здорового носителя робертсоновской транслокации может быть 6 типов гамет. Генотипы и фенотипы возможных потомков у носителя робертсоновской транслокации rob(14;21) представлены на схеме

либо клинических проявлений. Однако для их потомства существует определенный риск возникновения хромосомных аномалий. Это связано с возможностью образования несбалансированных гамет во время мейотического деления клеток. Схема формирования гамет и образующихся при оплодотворении зигот у носителей транслокаций представлена на рис. 20.1. У носителей реципрокной транслокации могут сформироваться четыре типа гамет: 1) с нормальным набором хромосом; 2) и 3) с частичной нуллисомией по одной хромосоме и частичной дисомией по другой хромосоме, вовлеченных в транслокацию; 4) с наличием сбалансированной транслокации.

Вероятность образования каждого из четырех типов гамет одинакова, в связи с чем можно ожидать, что риск рождения детей с несбалансированной хромосомной перестройкой для носителя сбалансированной перестройки составляет не менее 50%. Однако, величина ожидаемого риска значительно завышена, о чем свидетельствуют полученные эмпирические данные. Это связано с существованием механизма элиминации несбалансированных по хромосомному материалу гамет, зигот или эмбрионов. В результате в семьях носителей реципрокных транслокаций значительно повышается риск спонтанного аборта или мертворождения, который достигает 30%.

Транслокации второго типа называют **робертсоновскими.** В них, как правило, вовлечены акроцентрические хромосомы. Транслокационная хромосома может иметь одну или две центромеры. При наличии двух центромер (такую хромосому называют дицентриком) одна из них супрессирована. В результате разрывов короткие плечи двух хромосом утрачиваются, а их длинные плечи сливаются. Вместо четырех хромосом из двух пар образуются три хромосомы, две из которых нормальные, а одна представлена длинными плечами хромосом обеих пар (см. рис. 13.10).

Таким образом, при анализе хромосомного набора в кариотипе носителя такой транслокации обнаруживается 45, а не 46 хромосом. В большинстве случаев носители робертсоновской транслокации не имеют клинических проявлений, так как потеря коротких плеч акроцентрических хромосом может быть компенсирована функционированием других генов. У носителей робертсоновской транслокации может сформироваться шесть типов гамет, однако, частота рождения детей с несбалансированными хромосомными перестройками у такого носителя ниже, чем можно было бы ожидать, что связано с элиминацией гамет, зигот или эмбрионов, имеющих хромосомную перестройку. В представленном на рисунке случае летальными будут зиготы, образовавшиеся в результате оплодотворения гамет с нуллисомией и дисомией по хромосоме 14, а также гамет с нуллисомией по хромосоме 21. Три другие типа зигот – с трисомией по хромосоме 21, нормальные и несущие робертсоновскую транслокацию – теоретически должны образовываться с равной частотой. Однако на практике, эмпирический риск рождения ребенка с синдромом Дауна у таких носителей значительно меньше и составляет при носительстве транслокации матерью – 7%, а отцом – 3% (гл. 25). Необходимо отметить, что риск рождения ребенка со сбалансированной транслокацией соответствует, теоретически ожидаемому. В большинстве случаев носители таких транслокаций здоровы. Однако у некоторых их потомков, имеющих ту же сбалансированную транслокацию, описано появление пороков развития и интеллектуального дефицита. Это можно объяснить возникновением

кроссинговера между гомологичными хромосомами с вовлечением транслоцирова ного участка. В результате неравного кроссинговера возможно образование микр делеции и трисомии по определенному хромосомному сегменту, которые и буд причиной появления клинических симптомов. Это обстоятельство необходимо уч тывать при проведении дородовой диагностики при медико-генетическом консул тировании. В подобных случаях для окончательного суждения о состоянии здоров будущего ребенка необходимо использовать высокоразрешающие методы исслед вания кариотипа (в том числе, методы ДНК-анализа).

Существуют особенности проведения медико-генетического консультировани тех семьях, где один из супругов является носителем робертсоновской транслокац с вовлечением двух хромосом одной пары (например, 21/21), когда образуется од хромосома, представленная только длинными плечами. Хромосомы, состоящие двух идентичных плеч, называют **изохромосомами**. Часто они образуются в резуль те поперечного деления центромеры в метафазе. Существует равная вероятность п явления изохромосом по короткому и по длинному плечу, однако при исследовани кариотипа человека изохромосомы по длинному плечу выявляются значительно ч ще. Возможно, это связано с тем, что изохромосомы по короткому плечу нестабил ны и их носители менее жизнеспособны. Все потомки носителя изохромосомы 21 і длинному плечу будут иметь хромосомные перестройки — моносомию или трис мию по вовлеченной в транслокацию хромосоме. Учитывая, что моносомии по аут сомам, как правило, летальны, все живорожденные потомки носителя такой тран локации будут иметь трисомию по хромосоме 21. Таким образом, риск рождения р бенка с синдромом Дауна у носителей робертсоновской транслокации с вовлечен ем двух хромосом из одной 21-й пары будет составлять 100%, что необходимо раз яснить супружеским парам (гл. 25).

20.1.2. СХЕМА ЗАПИСИ ЧИСЛЕННЫХ И СТРУКТУРНЫХ АНОМАЛИЙ ХРОМОСОМ

При описании аномального кариотипа используют дополнительные символы, ук зывающие тип и характер хромосомной перестройки. В случае численных аномали хромосом (полиплоидий) первым приводится общее количество хромосом, кратн гаплоидному. Например, триплоидный кариотип записывается так: 69,ХХУ и 69,XXX.

При наличии анеуплоидий по аутосомам после указания общего количества хр мосом и пола человека ставится знак «+» при увеличении количества хромосом в о ной паре или знак «—» при уменьшении. Например, трисомия по 18 хромосоме мужчины записывается как: 47,XY,+18, а моносомия по 13 хромосоме в женском к риотипе записывается как 45,XX,–13. Напомним, что полная моносомия по любо аутосоме летальна и может определяться только у абортусов и мертворожденных. Н сколько по-иному записываются количественные перестройки, затрагивающие по ловые хромосомы. Если произошло увеличение или уменьшение числа половых хр мосом, то знак «+» или «—» не ставится, а просто записываются их символы в нео

ходимом количестве. Приведем некоторые примеры записи количественных аномалий половых хромосом:

45,ХО – моносомия по Х-хромосоме (синдром Шерешевского–Тернера)

47,XXX – трисомия по Х-хромосоме у женщины

47,XXY – кариотип с дополнительной Х-хромосомой у мужчины (синдром Клайнфельтера).

При описании структурных аномалий вначале, как и при описании нормального кариотипа, указывается общее количество хромосом, затем – набор половых хромосом, определяющих пол обследованного, после чего ставится запятая и приводится описание характера структурной перестройки: делеция обозначается del, инверсия – inv, дупликация – dup, транслокация – t, кольцевая хромосома – r, инсерция – ins. После этого, в скобках, указывается номер хромосомы – 46,XY,del(2), а при межхромосомных обменах - номера хромосом, вовлеченных в перестройку. Если в перестройку были вовлечены две хромосомы (и более), то для отделения их друг от друга ставится точка с запятой и первой записывается хромосома, имеющая меньший номер. В том случае, если удается идентифицировать сегменты, подсегменты и полосы хромосом, в которых произошли разрывы, то они указываются в следующих скобках. Так, например, запись 46,XY,del(2)(2q14.1) означает, что речь идет о разрыве в первой субъединице четвертого сегмента первой полосы длинного плеча второй хромосомы. Примеры записи структурных перестроек хромосом приведены в табл. 20.1.

Таблица 20.1. **Схема записи кариотипа человека при наличии основных структурных перестроек хромосом**

Запись кариотипа	Характер перестройки
46,XY,inv(3) (p12; p23)	Парацентрическая инверсия хромосомы 3 с точками разрыва в 12 сегменте короткого плеча и 23 сегменте длинного плеча у мужчины
46,XX,inv(9)(p13;q23)	Перицентрическая инверсия хромосомы 9 (точки разрыва произошли в 13 сегменте короткого плеча и 23 сегменте длинного плеча) у женщины
46,XY,t(8;15); (q15;p21)	Реципрокная транслокация участка длинного плеча хромосомы 8 на короткое плечо хромосомы 15, с точками разрыва в 15 сегменте длинного плеча хромосомы 8 и 21 сегменте короткого плеча хромосомы 15
45,XX,rob(15;21)(q10;q10)	Робертсоновская транслокация с потерей коротких плеч 15 и 21 хромосом. Разрыв и воссоединение произошли в 10 сегменте длинных плеч обеих хромосом
46,XX,del(8)(p11-pter)	Концевая делеция короткого плеча 8 хромосомы у женщины, начинающаяся с точкой разрыва в 11 сегменте
46,XX,3p+(p21-pter)	Частичная трисомия (или дупликация) короткого плеча хромосомы 3 у женщины
46,XX,fra(X)(q27.3)	Выявлен участок ломкой Х-хромосомы с точкой разрыва в 27 сегменте длинного плеча у мужчины
46,XX,r(9)	Наличие кольцевой хромосомы 9 у женщины
46,X,i(Xq)	Изохромосома Х по длинному плечу
46,XY,4p–	Моносомия по короткому плечу хромосомы 4 у мужчины

Хромосомные перестройки могут обнаруживаться во всех клетках организма (полная форма хромосомного синдрома) или в определенном клоне клеток (мозаичная форма). Полные формы хромосомных аномалий могут быть унаследованы от родителей, при наличии носительства ими хромосомной перестройки или возникать de novo в одной единственной гамете, давшей начало новому организму. Появление мозаицизма обусловлено возникновением мутаций в зиготе, сформированной нормальными гаметами в процессе клеточного деления во внутриутробном периоде. При обнаружении мозаицизма обозначение кариотипов различных клеточных клонов разделяются косой чертой (/). Например, запись кариотипа 45,X/47,XXX (50%/50%) означает, что при цитогенетическом исследовании препарата обнаружены два клона клеток – один с моносомией по X-хромосоме, а другой с трисомией по X-хромосоме, в соотношении 1:1. Согласно требованиям современной номенклатуры в конце записи в квадратных скобках должны быть указаны абсолютные количества клеток в клоне каждого типа, обнаруженные при цитогенетическом исследовании.

20.2. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ХРОМОСОМНЫХ СИНДРОМОВ

Характер и тяжесть клинических симптомов при различных типах хромосомных перестроек, определяются степенью нарушения генетического баланса и, как следствие, гомеостаза в организме человека. Можно отметить лишь некоторые общие закономерности клинических проявлений хромосомных синдромов.

1. Недостаток хромосомного материала приводит к более выраженным клиническим проявлениям, чем его избыток. Частичные моносомии (делеции) по определеныым участкам хромосом сопровождаются более тяжелыми клиническими проявлениями, чем частичные трисомии (дупликации), что обусловлено потерей ряда генов, необходимых для роста и дифференцировки клеток. В этом случае структурные и количественные перестройки хромосом, в которых локализованы гены, экспрессирующиеся в раннем эмбриогенезе, часто оказываются летальными и обнаруживаются у абортусов и мертворожденных. К гибели эмбриона на ранней стадии развития приводят полные моносомии по аутосомам, а также трисомии по 1, 5, 6, 11 и 19 хромосомам. Наиболее часто встречаются трисомии по хромосомам 8, 13, 18 и 21.

2. Для большинства хромосомных синдромов, обусловленных аномалиями аутосом, характерны пренатальная гипотрофия (малый вес ребенка при доношенной беременности), пороки развития двух и более органов и систем, а также задержка темпов раннего психомоторного развития, олигофрения и снижение показателей физического развития ребенка. У детей с хромосомной патологией часто выявляют увеличение количества, так называемых, стигм дизэмбриогенеза или малых аномалий развития. В случае наличия пяти и более таких стигм говорят о повышении порога стигматизации у человека. К стигмам дизэмбриогенеза можно отнести наличие сандале-

видной щели между первым и вторым пальцами на ногах, диастему (увеличение расстояния между передними резцами), расщепление кончика носа и другие.

3. Для аномалий половых хромосом, в противоположность аутосомным синдромам, не характерно наличие выраженного интеллектуального дефицита, некоторые больные имеют нормальное или даже выше среднего умственное развитие. У большинства больных с аномалиями половых хромосом возникает бесплодие и невынашивание беременности. Необходимо отметить, что бесплодие и самопроизвольное прерывание беременности при аномалиях половых хромосом и аутосом имеет различные причины. При аномалиях аутосом прерывание беременности часто обусловлено наличием хромосомных перестроек, несовместимых с нормальным эмбриональным развитием, или элиминацией несбалансированных по хромосомному материалу зигот, эмбрионов и плодов. При аномалиях половых хромосом в большинстве случаев наступление беременности и ее вынашивание невозможно по причине аномалии сперматозоидов или аплазии или резкой гипоплазии, как наружных, так и внутренних половых органов. В целом, аномалии половых хромосом приводят к возникновению менее выраженных клинических симптомов, чем аномалии аутосом.

4. Тяжесть клинических проявлений зависит от соотношения нормального и аномального клеточных клонов.

5. Полные формы хромосомных аномалий характеризуются более тяжелыми клиническими проявлениями, чем мозаичные.

Таким образом, учитывая все клинико-генетические и генеалогические данные больных с хромосомными синдромами, показания к исследованию кариотипа у детей и взрослых следующие:

- малый вес новорожденного при доношенной беременности;
- врожденные пороки развития двух и более органов и систем;
- врожденные пороки развития двух и более органов и систем в сочетании с олигофренией;
- недифференцированная олигофрения;
- бесплодие и привычное невынашивание беременности;
- наличие сбалансированной хромосомной перестройки у родителей или сибсов пробандов.

20.2.1. КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СИНДРОМОВ, СВЯЗАННЫХ С АНОМАЛИЯМИ ПО ЧИСЛУ АУТОСОМ

Наиболее распространенный тип количественных аномалий хромосом — трисомии и тетрасомии по одной из пар. У живорожденных чаще всего встречаются трисомии по 8, 9, 13, 18, 21 и 22 аутосомам. При возникновении трисомии по другим аутосомам (особенно большим метацентрическим и субметацентрическим), эмбрион оказывается нежизнеспособным и гибнет на ранних сроках внутриутробного развития. Летальный эффект имеют и моносомии по всем аутосомам.

Выделяют два цитогенетических варианта трисомий: *транслокационный* и *регулярный*. Первый вариант достаточно редко выступает в качестве этиологического фактора и составляет не более 5% всех случаев трисомий по аутосомам. Транслокационные варианты синдромов хромосомных трисомий могут появляться у потомков носителей сбалансированных хромосомных перестроек (чаще всего, робертсоновских или реципрокных транслокаций и инверсий), а также возникать de novo.

Остальные 95% случаев трисомий по аутосомам представлены регулярными трисомиями. Существует две основные формы регулярных трисомий: полная и мозаичная. В подавляющем большинстве случаев (до 98%) обнаруживаются полные формы, возникновение которых может быть обусловлено, как гаметическими мутациями (нерасхождением или анафазным отставанием хромосомы при мейотическом делении одной единственной гаметы), так и наличием сбалансированных хромосомных перестроек во всех клетках родителей. В редких случаях наследование количественных хромосомных перестроек происходит от родителей, имеющих полную форму трисомии (например, по X- или 21-хромосоме).

Мозаичные формы трисомий составляют около 2% всех случаев и характеризуются различным соотношением нормальных и трисомных клеточных клонов, которое и определяет вариабельность клинических проявлений.

Приводим основные клинико-цитогенетические характеристики трех наиболее распространенных вариантов полных трисомий по аутосомам у человека.

20.2.1.1. ТРИСОМИЯ ПО 21-Й ХРОМОСОМЕ, ИЛИ СИНДРОМ ДАУНА (СД)

Синдром был впервые описан английским врачом Дж. Дауном в 1866 г., а цитогенетически охарактеризован Ж. Леженом в 1958 г. Это наиболее распространенная хромосомная патология, встречающаяся с частотой 1:700-800 новорожденных. Оба пола поражаются одинаково часто. 95% всех случаев синдрома Дауна представлено регулярной трисомией, возникающей в результате нерасхождения хромосом в мейозе и лишь 5% обусловлено наличием унаследованной от родителей или возникшей de novo робертсоновской транслокацией с вовлечением 21 хромосомы. Наиболее часто (примерно в 80% случаев) нерасхождение хромосом происходит во время первого мейотического деления, причем, в 2/3 случаев в женских половых клетках. Важно отметить, что вероятность нерасхождения значительно возрастает при увеличении возраста женщины. Так, частота рождения детей с синдромом Дауна у 20-летних женщин составляет 1:1800, у 30-летних – 1: 1000, а у 40-летних – 1: 100 новорожденных.

В подавляющем большинстве случаев (98%) выявляется полная форма СД, и лишь 2% больных имеют мозаичный вариант заболевания.

В настоящее время патогенетические механизмы возникновения клинических симптомов при увеличении хромосомного материала окончательно не расшифрованы. Предполагают, что ключевая роль в возникновении умственной отсталости при СД принадлежит увеличению дозы гена фермента супероксиддисмутазы, локализованного в области q22.3.

Клинические симптомы СД очень специфичны и позволяют диагностировать болезнь уже в родильном доме. Больные имеют характерное уплощенное лицо, монго-

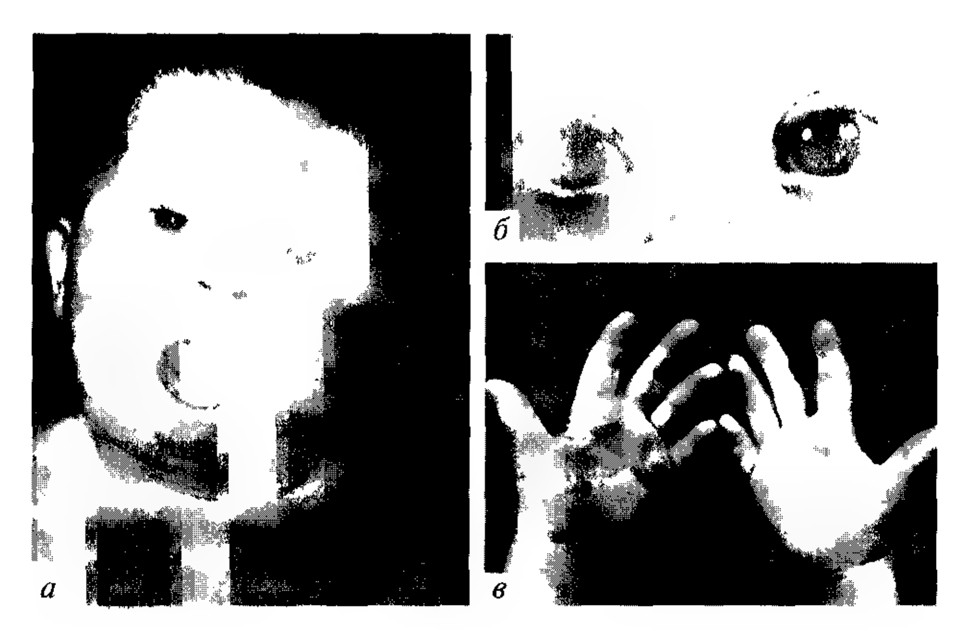


Рис. 20.2. Синдром Дауна. (Из: R.F. Mueller, I.D. Young, 2001)

лоидный разрез глаз, эпикант, короткий нос с плоской спинкой, макроглоссию (рис. 20.2.), брахицефалию, низко расположенные, как правило, деформированные ушные раковины. Еще одно проявление СД – изменение дерматоглифики: присутствие длинной поперечной складки на ладонях и двух кожных складок на мизинце. Кисти больных обычно короткие и широкие с клинодактилией мизинцев. Пороки сердца отмечаются у 53% больных, пороки развития желудочно-кишечного тракта – у 15% пораженных, аномалии почек выявляются лишь в 6% случаев. Для всех больных характерна мышечная гипотония и снижение роста, у взрослых, как правило, обнаруживается избыточный вес тела. Наиболее важный симптом при СД – олигофрения различной степени тяжести. Дети с СД обычно ласковы, терпеливы, послушны, что в ряде случаев, при использовании специальных обучающих программ приводит к овладению ими навыков самообслуживания, определенной социальной адаптации и даже освоению облегченной школьной программы. Продолжительность жизни больных с СД, как правило, снижена, они редко доживают до 40-летнего возраста, что связано со снижением клеточного и гуморального иммунитета, нарушением процессов репарации ДНК и формированием признаков преждевременного старения в мозге больных. Смерть часто наступает от сердечной недостаточности, интеркуррентных инфекций, а в ряде случаев онкологических заболеваний, прежде всего, лейкемии.

Диагностика заболевания осуществляется на основании клинического осмотра и анализа кариотипа больного. В случае выявления регулярной трисомии по 21-й хромосоме исследование кариотипа родителей больного не проводят. При обнаружении транслокационной формы заболевания этот этап медико-генетического консультирования семьи абсолютно необходим. Профилактика заболевания осуществляется

на основании дородовой диагностики, основанной на цитогенетическом и ультразвуковом обследовании плода (гл. 25). Такое обследование необходимо проводить в двух случаях:

1) если беременная женщина старше 35 лет (в связи со значительным увеличением риска возникновения хромосомных перестроек в этом возрасте);

2) если у одного из родителей больного выявлена робертсоновская транслокация с вовлечением 21 хромосомы.

20.2.1.2. ТРИСОМИЯ ПО 18-Й ХРОМОСОМЕ, ИЛИ СИНДРОМ ЭДВАРДСА (СЭ)

Синдром был впервые описан в 1960 г. Дж. Эдвардсом. Больной с множественными врожденными пороками развития имел добавочную хромосому из группы Е. Частота этого синдрома в популяции составляет 1:7000 новорожденных, причем, соотношение больных женского и мужского пола составляет 3:1. Показано, что риск рождения детей с СЭ не изменяется с увеличением возраста беременной женщины.

Дети с СЭ рождаются с пренатальной гипотрофией (средняя масса тела при рождении составляет 2340г). При рождении отмечается многоводие, гипоплазия плаценты, наличие единственной пупочной артерии.

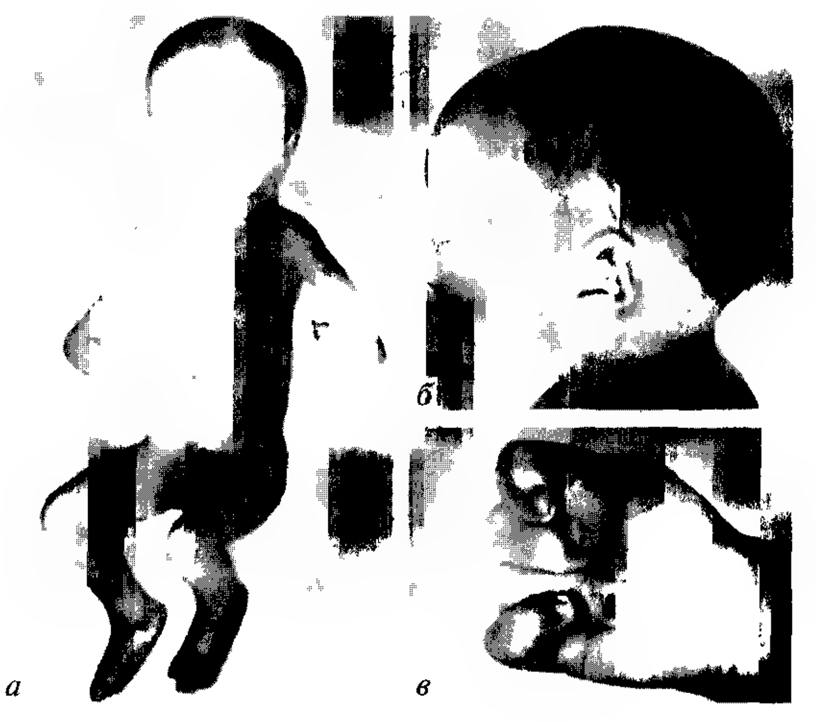


Рис. 20.3. Синдром Эдвардса.(Из: Г.И. Лазюк, 1979)

Фенотипические проявления СЭ многообразны. Наиболее типичны: задержка психомоторного развития (100%); гипоплазия скелетной мускулатуры и подкожной жировой ткани (50%); врожденные пороки сердца (90%); аномалии строения лица и черепа — долихоцефалия, микрофтальмия, низкое расположение ушных раковин, микрогнатия, укорочение глазных щелей, высокое небо, микрогения; флексорное положение пальцев кистей, с наличием характерного расположения пальцев (второй палец перекрывает третий, а пятый — четвертый); гипертрофия клитора, крипторхизм. Фенотип больных с СЭ представлен на рис. 20.3. Достаточно часто выявляются пороки развития желудочно-кишечного тракта (атрезия пищевода, незавершенный поворот кишечника, эктопия поджелудочной железы), мочеполовой системы (удвоение почек и мочеточников, облитерация мочеточников, гидро- и мегауретер) и центральной нервной системы (спинно-мозговые грыжи, гипоплазия мозолистого тела и мозжечка), а также пупочные и паховые грыжи. Продолжительность жизни детей резко снижена: 90% из них погибают до 1 года в результате присоединившихся интеркуррентных инфекций или наличия тяжелых врожденных пороков развития.

20.2.1.3. ТРИСОМИЯ ПО 13-Й ХРОМОСОМЕ, ИЛИ СИНДРОМ ПАТАУ (СП)

Синдром был впервые описан К. Патау в 1960 г. Частота встречаемости синдрома не превышает 1: 6000 новорожденных, оба пола поражаются с равной частотой. Так же как и при других формах полных трисомий, дети с СП рождаются с пренатальной гипотрофией, в результате беременности, осложненной многоводием. Клинические признаки синдрома достаточно специфичны и позволяют уже при рождении заподозрить наличие СП. К ним относятся: микроцефалия, тригоноцефалия, расщелина губы и неба, узкие глазные щели, широкий нос с запавшей переносицей, микрофтальмия, дефекты скальпа, а также поли- и синдактилия кистей и/или стоп (рис. 20.4.). Достаточно часто встречаются выраженные пороки развития мозга в виде голопрозэнцефалии, аринэнцефалии, гипоплазии мозжечка и сердца в виде дефектов межжелудочковой и межпредсердной перегородок. С различной частотой у больных отмечаются пороки почек, половых органов и кишечника. Тяжелые пороки развития приводят к ранней гибели больных с СП, продолжительность жизни которых редко превышает 1 год. Дети, доживающие до 2–3 летнего возраста, имеют выраженную степень умственной отсталости.

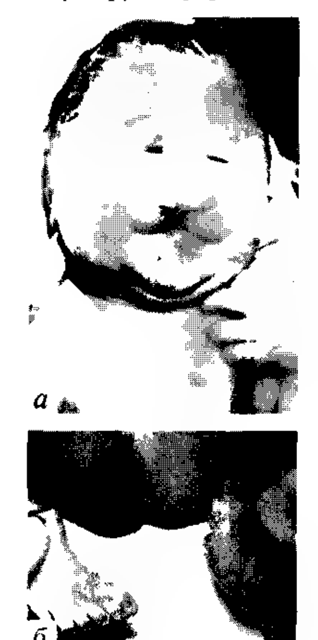


Рис. 20.4. Синдром Патау (Из: Козлова С.И., Е. Семанова, Н.С. Демикова, О.Е. Блинникова, 1987)

20.2.2. КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СИНДРОМОВ, СВЯЗАННЫХ С АНОМАЛИЯМИ ПО ЧИСЛУ ПОЛОВЫХ ХРОМОСОМ

Хромосомные перестройки, затрагивающие половые хромосомы, встречаются с частотой 1,5:1000 новорожденных и отличаются значительным разнообразием.

Наиболее распространены аномалии по числу половых хромосом: полисомии по Х-хромосоме у мужчин и женщин и моносомия по Х-хромосоме, приводящая к появлению женского фенотипа. В отличие от аутосом, для которых моносомии оказываются летальными, моносомия по Х-хромосоме у человека – наиболее частая патология половых хромосом. По-видимому, это объясняется тем, что в результате различий в количестве Х-хромосом у женщин и мужчин в процессе эволюции у человека выработался мощный механизм компенсации дозы генов в Х-хромосоме у лиц мужского пола, который и предотвращает появление тяжелых пороков развития у носителей анеуплоидий по Х-хромосоме. Х0 можно рассматривать как моносомию по Х- и нуллисомию по Y-хромосоме.

Полисомии по Y-хромосоме обнаруживаются достаточно редко, так как в большинстве случаев они не сопровождаются возникновением выраженных клинических симптомов.

Перестройки половых хромосом характеризуются вариабельностью не только количества дополнительных хромосом Х и Y, но и характера комбинации аномальных и нормальных клеточных клонов. К особенностям этой группы хромосомных синдромов можно отнести значительное число мозаичных вариантов (они составляют не менее 1/4 всех случаев полисомий по половым хромосомам). Выявляются две группы мозаичных кариотипов:

1) с наличием клонов с нормальным и аномальным кариотипом, определяющим либо мужской, либо женский пол (например, кариотипы 45,ХО/46,ХХ и 47,XXY/46,XY);

2) с сочетанием клонов клеток с нормальным женским и мужским кариотипом 46,ХХ/46,XY (50%/50%).

Появление первой группы кариотипов обусловлено существованием хромосомных перестроек в соматических клетках, механизм которых сходен с таковым при анеуплоидиях по аутосомам. Фенотипические проявления при таких аномалиях имеют значительное сходство с симптомами полных моносомии или трисомии по Х-хромосоме у лиц мужского и женского пола. Возникновение мозаичного кариотипа второй группы может быть следствием:

1) слияния двух оплодотворенных яйцеклеток;

2) оплодотворения ооцита двумя различными спермиями;

3) митотических ошибок во время первого дробления зиготы;

4) внутреннего обмена стволовыми кроветворными клетками между разнополыми дизиготными близнецами. В этом случае наружные половые органы имеют смешанное строение, т.е. наблюдается гермафродитизм. Аномалии внутренних половых органов определяются различной степенью развития производных мюллеровых и вольфовых протоков.

Структурные аномалии половых хромосом обусловливают неправильное формирование внутренних и наружных половых органов. В настоящее время основные механизмы развития зачатков мужских и женских половых органов расшифрованы, однако природа ряда феноменов остается не выясненной. Основные положения этого процесса следующие.

1. Формирование мужского пола происходит при наличии X- и Y-половых хромосом, а женского – при наличии двух X-хромосом. При этом в организме женщины включается механизм дозовой компенсации, в результате которого одна из X-хромосом инактивируется. Этот процесс часто называют **лайонизацией** в честь французской исследовательницы М. Лайон, которая в 1961 г. впервые показала, что одна из двух X-хромосом в клетках нормальной женщины находится в генетически неактивной форме. Эта хромосома в интерфазном ядре представлена в виде тельца Барра, интенсивно метилирована и не транскрибируется. Инактивация одной из X-хромосом происходит на ранних стадиях эмбриогенеза и носит случайный характер, то есть в различных клетках женского организма неактивная X-хромосома может быть как отцовского, так и материнского происхождения (см. гл. 12). В последние годы было показано, что инактивируются не все гены X-хромосомы. Часть из них, играющая важную роль в дифференцировке гонад и контроле фертильности женщины, сохраняет транскрипционную активность.

2. Процесс становления пола начинается с дифференцировки гонад после 4-й недели внутриутробного развития. До этого у эмбриона формируются закладки половых желез. Для этого процесса достаточно одной X-хромосомы, т.е. он протекает одинаково у лиц с нормальным кариотипом и с анеуплоидией по половым хромосомам. С 4-й по 12-ю недели образуются мюллеров и вольфов протоки. Из мюллерова протока в последующем формируются матка, фаллопиевы трубы и верхняя треть влагалища; вольфов проток обеспечивает закладку семенных пузырьков, семявыносящего протока, яичка и урогенитального синуса, из которого у мужчин образуется предстательная железа, половой член и мошонка, а у женщин нижняя треть влагалища и наружные половые органы. Таким образом, тип дифференцировки гонад определяется направленностью дифференцировки мюллеровых и вольфовых протоков, для нормального осуществления которой необходимо присутствие двух половых хромосом. Первые морфологические отличия мужской и женской гонад обнаруживаются на 6-7 неделе эмбрионального периода. Для правильного формирования яичников и половых органов необходимы две X-хромосомы, у больных с кариотипом XO гонады не дифференцируются и на их месте формируются соединительнотканные тяжи.

3. Необходимым условием развития мужских половых органов является присутствие на коротком плече Y-хромосомы гена *SRY*, который содержит 2 экзона и лишен интронов. Он кодирует белок, состоящий из 204 аминокислот и обеспечивающий дифференцировку клеток Сертоли. Нормальное развитие мужских половых органов определяется секрецией эмбриональным яичком двух веществ: антимюллерового гормона, секретируемого клетками Сертоли, и тестостерона, экскретируемого клетками Лейдига.

4. При агенезин гонад остальные признаки пола развиваются по женскому типу вне зависимости от набора половых хромосом (закон «автономной тенденции к феминизации»).

Таким образом, основные симптомы, возникающие при количественных перестройках половых хромосом, характеризуются разнообразными нарушениями структуры и функции половых органов и гормонозависимыми аномалиями роста. При этом аномалии строения внутренних органов, а также лицевого и мозгового черепа не характерны.

Далее приводятся клинико-генетические характеристики основных количественных перестроек половых хромосом.

20.2.2.1. МОНОСОМИЯ ПО X-ХРОМОСОМЕ, ИЛИ СИНДРОМ ШЕРЕШЕВСКОГО-ТЕРНЕРА (СШТ)

Заболевание впервые описано Н.А. Шерешевским в 1925 г., а в 1938 г. Г. Тернер выделил основные признаки этой болезни. Синдром встречается с частотой 1:2000–1:5000 новорожденных. Наиболее часто клинические проявления этого синдрома связаны с полным или мозаичным вариантом моносомии по X-хромосоме, однако, они могут наблюдаться и при структурных перестройках X-хромосомы (изохромосомах, делециях короткого и длинного плеча, кольцевых хромосомах, транслокации X/X).

При полной или мозаичной форме СШТ с наличием кариотипа 45,XO *или* 45,XO/46,XX клинические проявления характеризуются триадой признаков: гипогонадизмом с недоразвитием половых органов и вторичных половых признаков, гормонозависимым снижением роста и наличием врожденных пороков развития и дисморфических черт строения. Пороки развития половых органов многообразны и степень их дифференцировки зависит от соотношения нормального и аномального клеточного клона в кариотипе больного. При полной форме СШТ часто наблюдается агенезия гонад, отсутствие матки и фаллопиевых труб, первичная аменорея, недоразвитие вторичных половых признаков, связанное с недостатком эстрогенов (скудное оволосение на лобке и в подмышечных впадинах, недоразвитие молочных желез). Внешний вид больных достаточно характерен (рис. 20.5.). Уже при рождении можно выявить характерные признаки: крыловидные складки кожи на шее и лимфатический отек кистей и стоп. Приблизительно у четверти больных диагностируются пороки развития внутренних органов,

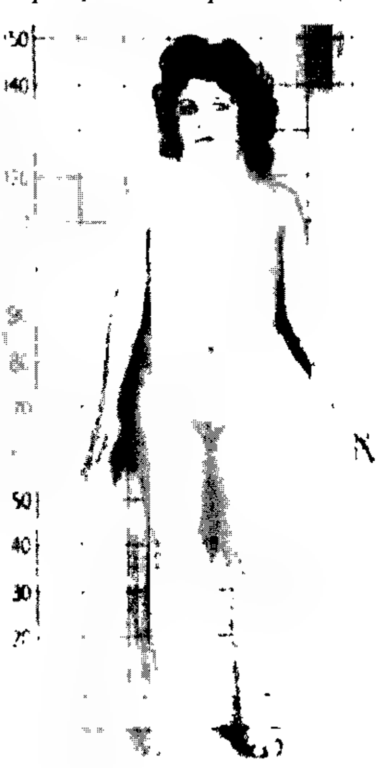


Рис. 20.5. Синдром Шерешевского-Тернера (Из: Ch.R. Scriver et al., 2001)

как правило, пороки сердца и почек. Наряду с этим часто выявляются малые признаки дизэмбриогенеза в виде эпиканта, низкого роста волос на шее, гиперплазии ногтевых пластин, высокого неба, укорочения метакарпальных костей, микрогнатии, воронкообразной грудной клетки. Рост больных, как правило, снижен и во взрослом возрасте не превышает 140 см. В подавляющем большинстве случаев женщины с полной формой СШТ бесплодны. Однако в последние годы появились сообщения о нескольких пациентках, родивших здоровых детей. Это оказалось возможным благодаря гормональному лечению, начатому в детском возрасте и приведшему к формированию тела матки и маточных труб.

20.2.2.2. ПОЛИСОМИИ ПО Х-ХРОМОСОМЕ У ЖЕНЩИН

Полисомии по Х-хромосоме могут встречаться как у мужчин, так и у женщин.

У женщин описано три вида полисомий по Х-хромосоме – трисомия (47,XXX), тетрасомия (48,XXXX) и пентасомия (49,XXXXX). При полисомиях по Х-хромосоме у женщин специфических клинических проявлений не выявлено. Нарушения полового развития при этом типе количественных перестроек половых хромосом выражены не резко или отсутствуют. Это связано с инактивацией всех дополнительных Х-хромосом в организме женщины и увеличением количества телец Барра. Для этой группы хромосомных синдромом не характерно возникновение мозаичных вариантов. Частота всех случаев полисомии-Х не превышает 1,3:1000, причем основную группу составляют больные с трисомией по Х-хромосоме.

Заподозрить наличие трисомии по Х-хромосоме при клиническом обследовании женщин достаточно сложно. Обнаруживается эта хромосомная перестройка, как правило, случайно при обследовании контингента женщин с умственной отсталостью или нарушением менструального цикла. У большинства больных отсутствуют какие-либо признаки нарушения развития и имеется нормальный фенотип. Часть женщин с кариотипом 47,XXX страдает нарушением менструального цикла, невынашиванием беременности и ранней менопаузой. У некоторых трисомия-Х сопровождается олигофренией в степени дебильности, нарушением поведения, истерическими реакциями, а у ряда женщин и эпилептическими приступами. Во взрослом возрасте может развиться шизофрения с выраженными изменениями личиости.

Тетрасомия и пентасомия по Х-хромосоме приводят к появлению более выраженных клинических симптомов. Наличие дополнительных Х-хромосом увеличивает риск возникновения умственной отсталости и соматических нарушений. Существенно чаще, чем у больных с трисомией, у этой группы женщин отмечаются дисморфические черты строения в виде эпиканта, глазного гипертелоризма, монголоидного разреза глаз, клинодактилии мизинцев, высокого неба, уплощения переносицы, укорочения шеи, синостоза лучевой и локтевой кости.

20.2.2.3. ПОЛИСОМИИ ПО Х-ХРОМОСОМЕ У МУЖЧИН

У лиц с мужским фенотипом описано несколько вариантов кариотипов, характеризующихся увеличением количества Х-хромосом. Наиболее часто встречается син-

дром Клайнфельтера – дисомия по Х-хромосоме, при наличии одной Y-хромосомы (кариотип 47,XXY). Это заболевание было впервые описано в 1942 г. и встречается с частотой 1,5 на 1000 новорожденных мальчиков. Первые признаки заболевания можно отметить в пубертатном возрасте. До этого периода развитие половых органов мальчиков происходит без отклонений и обеспечивается нормальным функционированием Y-хромосомы. Дисбаланс половых хромосом приводит к недоразвитию семенников, гипоплазии яичек и гипогонадизму. Больные имеют евнухоидный тип строения тела в сочетании с высоким ростом (рис. 20.6.). Часто формируется гинекомастия, скудный рост волос на лице и в подмышечных впадинах. Все больные бесплодны вследствие азооспермии. В части случаев наблюдается олигофрения в степени дебильности.

Рис. 20.6. Синдром Клайнфельтера

При увеличении количества Х-хромосом у мужчин, сочетающемся с наличием одной или двух Y-хромосом (кариотипы 48,XXXY и 48,XXYY) повышается вероятность возникновения выраженного интеллектуального дефицита, а также дисморфических черт строения лица. У таких мужчин, помимо гипогонадизма, крипторхизма, гипоплазии яичек и наружных половых органов, часто отмечается ассиметрия тела, укорочение ног и мышечная гипотония.

20.2.2.4. ПОЛИСОМИЯ ПО Y-ХРОМОСОМЕ

Наиболее часто встречается синдром полисомии по Y-хромосоме при наличии кариотипа 47,XYY. Частота этого синдрома составляет 1:1000 новорожденных мальчиков. Появление дополнительной Y-хромосомы в большинстве случаев не приводит к появлению аномалий строения и функционирования наружных и внутренних половых органов. Такие мужчины часто имеют нормальную фертильность, а вероятность рождения ребенка с хромосомными аберрациями у них не превышает общепопуляционные показатели. Лишь у определенной части больных наблюдается гипогенитализм и азооспермия. Особенностью фенотипических проявлений у обладателей этого типа хромосомной перестройки является высокий рост, склонность к антисоциальному поведению, агрессивности. Их речь достаточно односложна, с элементами моторной и сенсорной афазии.

Еще одной формой полисомии по Y-хромосоме является кариотип 48,XYYY. Считается, что частота возникновения этой хромосомной аномалии не превышает 1:50000 новорожденных. Описано лишь несколько таких больных, их фенотип был

сходен с фенотипом мужчин с синдромом 47, XYY: больные страдали импотенцией и бесплодием, также у них выявлялся гипогонадизм.

20.2.2.5. ВАРИАНТЫ ДИСГЕНЕЗИИ ГОНАД ПРИ АНОМАЛИЯХ ПОЛОВЫХ ХРОМОСОМ

Описано множество клинических фенотипов, возникающих при наличии полных и мозаичных форм различных аномалий половых хромосом, которые можно объединить в несколько групп. Первую группу составляют больные с овариальной дисгенезией, фенотипические проявления которой значительно варьируют в зависимости от характера перестроек Х-хромосомы. Основные проявления этой группы синдромов связаны с различной степенью нарушения процессов формирования гонад. Наиболее часто синдром овариальной дисгенезии возникает при наличии следующих кариотипов: 1) 46,XXp– (делеция короткого плеча Х-хромосомы); 2) 46,X, i(Xq) – изохромосома по длинному плечу; 3) 46,X,r(X) – кольцевая Х-хромосома. В ряде случаев обнаруживаются X/X и Х-аутосомные транслокации. Очень редко наблюдаются случаи с наличием изо-Х-хромосомы по короткому плечу, которые оказываются нестабильными и элиминируются в процессе клеточного деления. Это происходит в результате возникновения частичной трисомии по короткому плечу из-за нарушения нормального процесса лайонизации одной из Х-хромосом в результате потери инактивационного центра, расположенного в области ее длинного плеча.

Показано, что в случае овариальной дисгенезии гонад, обусловленной утратой хромосомного материала проксимальных сегментов короткого плеча Х-хромосомы, возникают различные признаки нарушения формирования гонад, а при утрате дистальных сегментов более выражена задержка роста больных. Делеции длинного плеча Х-хромосомы вызывают типичные симптомы синдрома Шерешевского -Тернера; при наличии концевых делеций или кольцевой Х-хромосомы в клинической картине преобладают разнообразные аномалии строения половых органов, в то время как рост больных не снижен и пороки развития отсутствуют.

Мозаичные варианты СШТ могут быть представлены клеточным клоном с моносомией по Х-хромосоме в сочетании с клоном, имеющем нормальную или несущую структурную перестройку Y-хромосому (кариотип 45,XO/46,XY). Это состояние обозначают как смешанную дисгенезию гонад. Наличие клеточного клона с моносомией по Х-хромосоме обусловливает возникновение агенезии внутренних половых органов и замещение их соединительной тканью, а существование клона клеток, содержащих Y-хромосому, приводит к появлению в организме гипоплазированных мужских половых органов. В том случае, если клоны клеток находятся в различных гонадах раздельно, возможно появление мужских и женских гонад различной степени дифференцировки. Так, с одной стороны на месте гонад у больного могут дифференцироваться фиброзные тяжи, а с другой – недоразвитые элементы тестикулярной ткани и недифференцированные гоноциты.

Необходимо отметить, что процесс формирования гонад является многоступенчатым и его нарушение может быть связано не только с количественными и струк-

Таблица 20.2. **Варианты дисгенезии гонад при структурных и количественных перестройках хромосом**

Варианты дисгенезии гонад	Возможный кариотип
Овариальная	1) 45, XO; 2) 45,XO/46,XX; 3) 46,XX p–; 4) 46,X,i(Xq); 5) 46,XX,i(Xp); 6) 46,X,t(Xp; Xp)
Чистая	1) 46,X,t(Xq; Xq); 2) 46,XXq –
Тестикулярная	1) 46,X,i(Yp); 2) 45,XO/46,XY

турными перестройками половых хромосом, но и мутациями в генах, экспрессирующихся в тканях гонад и обеспечивающих правильное чередование цепи морфологических изменений. Такие мутации способны детерминировать как инверсии пола, так и аномалии развития мужских половых органов. Под *инверсией пола* понимают формирование мужского фенотипа при наличии женского кариотипа (46,XX) и формирование женского фенотипа при наличии мужского кариотипа (46,XY). В первом случае говорят об XX-инверсии пола или синдроме де ла Шапелля, а во втором об XY-инверсии пола, которая включает несколько синдромов, в том числе и синдром тестикулярной феминизации и неполной маскулинизации. Наиболее часто к XX-инверсии пола приводит транслокация участка Y-хромосомы, содержащего ген SRY, на X-хромосому.

Моногенные синдромы нарушения половой дифференцировки будут рассмотрены в гл. 21.

глава 21

МОНОГЕННЫЕ БОЛЕЗНИ ЧЕЛОВЕКА

Моногенные заболевания – большая группа наследственных болезней, возникновение которых обусловлено единичными мутациями, нарушающими функцию соответствующего белка или приводящими к полному отсутствию этой функции. Для моногенных болезней характерны аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный и сцепленный с полом типы наследования. В последние годы, в результате изучения клинико-генетических характеристик моногенных заболеваний показано, что, в соответствии с законами Менделя, постулирующими наличие экспрессии двух аллелей гена, полученных от обоих родителей, наследуется только 2/3 из них, в наследственной передаче остальных наблюдается отклонение от менделевских закономерностей. В данной главе будут рассмотрены только заболевания первой группы, к которой относится большинство аутосомно-доминантных и аутосомно-рецессивных патологий. Характеристики заболеваний, наследование которых имеет отклонения от менделевских закономерностей, будут представлены в гл. 22.

21.1. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Понятие эпидемиологии заболеваний включает знание об их распространенности/частоте в разных регионах, а также механизмах, влияющих на эти показатели. В медицинской генетике знание этих параметров обусловлено необходимостью расчета и планирования потребностей медицинской и социальной помощи больным и инвалидам. Наибольшее значение для достижения этой цели имеет показатель *распространенности* наследственных заболеваний, который рассчитывается, как отношение количества больных, зарегистрированных на момент обследования, либо за определенный промежуток времени, к размеру обследованной популяции (к численности всего населения – для аутосомных заболеваний, и к численности мужского населения – для Х-сцепленных рецессивных болезней). В большинстве случаев этот показатель рассчитывается на 100 тыс. населения.

Для некоторых заболеваний, прежде всего тех, которые существенно сокращают продолжительность жизни, показателем их накопления служит частота. *Частоту наследственной патологии* оценивают как отношение количества новорожденных, у которых может возникнуть наследственное заболевание в течение всей жизни, к об-

щему количеству живорожденных, появившихся за данный период (обычно она рассчитывается на 1000 живорожденных).

При оценке *спектра наследственной патологии* проводится анализ вклада в структуру заболеваемости отдельных нозологических форм и групп болезней с различным типом наследования, а также соотношения количества частых и редких форм наследственных заболеваний в разных регионах.

Все эти показатели генетического груза варьируют в различных популяциях. Согласно современным оценкам наследственные моногенные заболевания выявляются у 2,4% населения, а их средняя частота составляет 10:1000 новорожденных. Аутосомно-доминантные заболевания (средняя частота – 7:1000) составляют 60%, а аутосомно-рецессивные болезни (средняя частота 2,5:1000) – 30% от всей моногенной патологии. В популяциях человека число рецессивных мутаций достаточно велико. Считается, что каждый человек является носителем 3-4 эквивалентов летальных мутаций. Заболевания, наследующиеся сцепленно с полом, а также митохондриальные болезни, встречаются лишь в 10% случаев, причем наибольший вклад вносят Х-сцепленные болезни, средняя частота которых в большинстве обследованных популяций составляет 0,4:1000.

В медико-генетической практике в зависимости от уровня распространенности принято условно выделять три группы заболеваний: широко распространенные заболевания, встречающиеся не реже чем 1:10000; заболевания со средним уровнем распространенности – 1:10001 – 1: 40000 случаев, и редкие, распространенность которых не превышает 1:40001. Такое деление удобно для планирования объема и выбора методов профилактики наследственной патологии.

В табл. 21.1. представлены данные о частоте встречаемости наиболее распространенных моногенных заболеваний. Безусловно, значения, указанные в таблице, являются усредненными: в отдельных популяциях и этносах заболевания, относящиеся к группе широко распространенных, могут встречаться редко, а наследственные патологии, классифицируемые как редкие, напротив оказаться распространенными. Например, у евреев – выходцев из Европы (так называемых «ашкенази») одно из наиболее частых аутосомно-рецессивных заболеваний – фенилкетонурия – обнаруживается достаточно редко, при этом отмечается значительное увеличение частоты таких аутосомно-рецессивных заболеваний, как амавротическая идиотия Тея–Сакса, синдром Блума, абеталипопротеинемия, семейная дизавтономия Рейли–Дея и торсионная дистония, довольно редко встречающихся в других популяциях. В финской популяции значительное распространение получили такие редкие в других популяциях болезни, как миоклонус-эпилепсия Унферихта–Лундборга и аспартил-глюкозаминурия. Показано преимущественное возникновение периодической болезни у армян, увеличение частоты адреногенитального синдрома у эскимосов, гемоглобинопатий и недостаточности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы у населения стран Африки и Средиземноморья.

Межпопуляционные различия распространенности наследственной патологии обусловлены динамичным изменением генетической структуры популяции человека под действием **факторов популяционной динамики**, нарушающих равновесие популяций. К таким факторам относятся: отбор, миграционные и мутационный процессы, брачная ассортативность и дрейф генов. Воздействие этих факторов приводит к

Таблица 21.1. **Частота наиболее распространенных моногенных болезней человека**

Заболевание	Тип наследования	Частота
Семейная гиперхолестеролемия	АД	1:500 гетерозигот
Полипоз толстой кишки	АД	1:15000
Синдром Марфана	АД	1:20000
Наследственный сфероцитоз	АД	1:5000
	АД	1:1250
Хорея Гентингтона	АД	1:25000
Несовершенный остеогенез	АД	1:20000
Миотоническая дистрофия	АД	1:10000
Нейрофиброматоз 1 типа	АД	1:3000
	АД	1:15000
Альбинизм	АР	1:10000
Муковисцидоз	АР	1:3500
Спинальная мышечная атрофия	АР	1:6000
Фенилкетонурия	АР	1:12000
Гемофилия А	Х-сцепленный	1:10000
Прогрессирующая мышечная дистрофия Дюшенна	Х-сцепленный	1:3500
Тестикулярная феминизация	Х-сцепленный	1:64000
Синдром Мартина–Белл	Х-сцепленный	1:1250
	Х-сцепленный	1:4000

менению генетического состава популяции и может обусловить как преобладание, так и снижение, а иногда и практически полное исчезновение тех или иных форм наследственных заболеваний. Вклад отдельных факторов популяционной динамики в изменение показателей распространенности заболеваний с аутосомно-рецессивным и аутосомно-доминантным типом наследования различен.

Отбор обусловлен различной приспособленностью особей с разными генотипами, приводящей к преимущественному воспроизведению одних и элиминации других, т.е. направлен в пользу или против определенных генотипов. В человеческих популяциях наиболее интенсивно происходят следующие виды отбора: 1) против гомозигот и гемизигот по рецессивному аллелю (например, при фенилкетонурии, спинальной мышечной атрофии, миопатия Дюшенна); 2) в пользу гетерозигот по рецессивному аутосомному (например, при серповидноклеточной анемии, муковисцидозе, фенилкетонурии) или Х-хромосомному аллелю (глюкоза-6-фосфатдегидрогеназная недостаточность); 3) против гетерозигот по доминантному аллелю (ахондроплазия, туберозный склероз).

Отбор против гомозигот по рецессивному аллелю или против гетерозигот по доминантному аллелю направлен на уменьшение продолжительности жизни больного и снижение его репродуктивных способностей. Действие отбора приводит к гибели больных в раннем возрасте или уменьшению шансов оставления ими потомства. Несмотря на это распространенность заболеваний в популяциях поддерживается практически на постоянном уровне. Это связано как с возникновением новых доминантных мутаций (для АД-заболеваний), так и с действием отбора в пользу гетерозигот по рецессивному аллелю (в случае АР-заболеваний).

Отбор в пользу гетерозигот по рецессивному аллелю обусловлен селективным преимуществом гетерозигот перед гомозиготами по нормальному и патологическому аллелям. В большинстве случаев механизмы сохранения и поддержания определенного уровня гетерозигот в популяциях человека не установлены. Имеющиеся данные позволяют высказать лишь некоторые предположения. Так, считается, что в доантибиотиковую эру гетерозиготы по мутациям в гене муковисцидоза имели селективное преимущество в связи с их устойчивостью к легочным инфекциям и холере. Известно, что распространение различных типов гемоглобинопатий и недостаточности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в популяциях Средиземноморья обусловлено селективным преимуществом гетерозигот, а именно их устойчивостью к малярии, которая была широко распространена в этом регионе. Предполагается, что гетерозиготы по мутации в гене фенилаланингидроксилазы, приводящей в гомозиготном состоянии к одному из наиболее частых наследственных заболеваний – фенилкетонурии, устойчивы к токсическому эффекту охратоксина. Этот токсин, продуцируемый некоторыми видами плесневых грибов (в прошлом постоянных «обитателей» амбаров для хранения зерна), способен вызывать самопроизвольные аборты у беременных. Женщины, гетерозиготные по мутациям в гене фенилаланингидроксилазы, а, следовательно, устойчивые к действию этих микотоксинов, обладали селективным преимуществом.

Несмотря на развитие медицинской помощи больным, отбор продолжает действовать в популяциях человека как во время внутриутробного онтогенеза (50-70% зачатий не приводит к рождению живого ребенка), так и в постнатальном периоде. В последние годы в связи с развитием методов дородовой диагностики наследственных заболеваний интенсивность пренатального отбора увеличивается. Эмбрион и плод с пороками развития, а также с хромосомными и моногенными заболеваниями, выявленный с помощью методов инвазивной и неинвазивной диагностики, обычно элиминируют. С другой стороны, внедрение новых методов лечения несколько ограничивает постнатальный отбор. Так разработка эффективных способов ведения больных с фенилкетонурией, муковисцидозом и адреногенитальным синдромом привела к увеличению продолжительности жизни таких пациентов и обусловила возможность оставления ими потомства. Это приводит к сохранению патологических аллелей генов этих заболеваний в популяции и, в конечном итоге, к увеличению их распространенности.

Определенное значение в накоплении заболеваний с различным типом наследования имеет **дрейф генов** – случайные колебания частот аллелей. Этот механизм действует в изолированных или частично подразделенных популяциях, состоящих из отдельных субпопуляций. Частными случаями этого фактора популяционной динамики являются *инбридинг* и *эффект основателя* (см. гл. 17).

Высокий уровень инбридинга в небольших изолированных популяциях, приводит к увеличению частоты кровнородственных браков, накоплению гетерозигот по рецессивным аллелям и распространению аутосомно-рецессивных заболеваний. Например, в высокоинбредном религиозном изоляте амишей в США, численность которого насчитывает 80 тыс. человек, выявлено несколько десятков аутосомно-рецессивных заболеваний, не обнаруженных в других человеческих популяциях. Вместе с тем показано, что в популяциях, с длительно сохраняющимся высоким уровнем инбридинга, возможна практически полная элиминация патологических аллелей распространенных аутосомно-рецессивных заболеваний.

Значительная роль в распространении аутосомно-доминантных наследственных болезней принадлежит такому фактору популяционной динамики, как эффект основателя. Этот механизм накопления мутантных аллелей реализуется в результате миграции одного или небольшой группы носителей такого аллеля. С течением времени в данной популяции увеличивается частота заболевания, обусловленного этим мутантным аллелем, а при генеалогическом анализе устанавливается, что все больные унаследовали его от одного или нескольких мигрантов. Примерами могут служить очаги территориального накопления некоторых АД-заболеваний в ряде популяций: хореи Гентингтона в Японии; одной из форм порфирии в Южной Африке; миотонической дистрофии, окулофарингеальной миопатии и семейной гиперхолестеролемии у канадцев французского происхождения.

Таким образом, распространение наследственной патологии в популяциях человека, имеющих ряд особенностей по сравнению с природными сообществами, подчиняется единым закономерностям поведения генов в популяциях, основы которых изложены в гл. 17.

21.2. ЭТИОЛОГИЯ МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Этиологическим фактором моногенных заболеваний являются мутации в одном или двух аллелях определенного гена. Под мутацией в медицинской генетике понимают любое изменение структуры ДНК, приводящее к возникновению клинических симптомов. Мутации могут возникать в смысловых или в регуляторных участках гена и приводить к нарушению процессов транскрипции или трансляции, что обусловливает уменьшение или прекращение синтеза белкового продукта или изменение его нормальной структуры и свойств. К нарушению процесса транскрипции приводят, прежде всего, мутации в области промотора гена, в 5′-донорном и 3′-акцепторном сайтах интрона, в кэп-сайте, а также в регуляторных областях и районах энхансеров (*негативный позиционный эффект*). Описан ряд наследственных заболеваний, обусловленных мутациями в генах, которые кодируют факторы транскрипции. Белковые продукты этих генов способны соединяться с регуляторными участками ДНК многих структурных генов, приводя к активации или репрессии процессов транскрипции. Тканеспецифические транскрипционные факторы участвуют в процессах клеточной дифференцировки, роста, миграции и апоптоза, следовательно, мутации в их генах могут нарушать эти процессы. В большинстве случаев мутации, прекращающие транскрипцию гена, обусловливают развитие тяжелых форм наследственных заболеваний. (Основные типы мутаций описываются в гл. 13).

Причиной большинства моногенных болезней человека являются мутации в транскрибируемых частях гена; мутации в регуляторных областях обусловливают не более чем 0,1% моногенных заболеваний. Чаще всего идентифицируются, так называемые, точковые мутации, представляющие собой однонуклеотидные замены и делеции. В группе точковых мутаций наиболее распространены *миссенс-мутации* — однонуклеотидные замены в кодирующей части гена, приводящие к замене одной

аминокислоты на другую в полипептидной цепи. Миссенс-мутации обнаруживаются у 50% больных с моногенными наследственными заболеваниями. В результате этих мутаций длина белка остается неизменной, но его пространственная конфигурация меняется, вследствие чего может нарушаться его функционирование, в частности процессы взаимодействия с активными центрами рецепторов клеток-мишеней, присоединение и катализ веществ, и другие. Функциональная активность такого мутантного белка будет прямо зависеть от значимости участка, в котором произошла мутация, для реализации нормальной функции белка.

При возникновении *нонсенс-мутации* также происходит замена одного нуклеотида в молекуле ДНК, однако, в отличие от миссенс-мутации, в этом случае происходит образование терминирующего кодона (стоп-кодона), прекращающего процесс трансляции. Такой тип мутаций обнаруживается примерно у 12,2% больных. В этом случае синтезируется укороченный белок с измененными функциями. Нонсенс-мутации обычно приводят к выраженному фенотипу болезни, однако тяжесть клинических проявлений зависит от локализации точковой замены: чем она ближе к началу транскрипции, тем короче белковый продукт гена и тяжелее течение болезни. Такие укороченные белки, как правило, не способны выполнять свои функции и быстро деградируют.

Еще одним типом однонуклеотидных замен являются мутации, возникающие на границе экзонов и интронов, так называемые *сплайсинговые мутации*, выявляемые у 9,5% больных. При наличии таких мутаций нарушается процессинг первичного РНК продукта, в результате чего не происходит вырезание определенного интрона или делетируется смежный с ним экзон.

Наряду с точковыми мутациями довольно часто причиной наследственных заболеваний человека являются *делеции* и *инсерции* сегмента ДНК размером от одного нуклеотида до субхромосомного сегмента. Они выявляются у 16,5% и 6% больных, соответственно. Описаны заболевания, возникновение которых связано с инсерцией транспозоноподобных мобильных элементов генома. Если количество делетированных или вставленных нуклеотидов не кратно трем, рамка считывания генетического кода сдвигается, что приводит к образованию белка, не способного нормально функционировать.

Если нонсенс-мутации или мутации со сдвигом рамки считывания расположены в 5′-области гена, то они могут приводить к прекращению процессов транскрипции и отсутствию белкового продукта гена. Такие мутации часто называют нулевыми (null mutation).

При некоторых наследственных моногенных заболеваниях роль этиологического фактора играют *инверсии*. Например, 45% случаев гемофилии А, наиболее распространенного заболевания с Х-сцепленным рецессивным типом наследования, обусловлено наличием крупной инверсии, захватывающей 22-й интрон и 1–22-й экзоны гена F8C (восьмого фактора свертывания крови), расположенного в длинном плече Х-хромосомы (Xq28). Возникновение такой инверсии – результат необычной структуры гена. Показано, что в нем, локализованы два дополнительных гена, природа которых до настоящего времени не расшифрована (феномен «гена в гене»). Один из этих генов (*F8A*) полностью расположен в 22-ом интроне и транскрибируется в направлении от 3′-конца до 5′ (т.е., в противоположном традиционному напра-

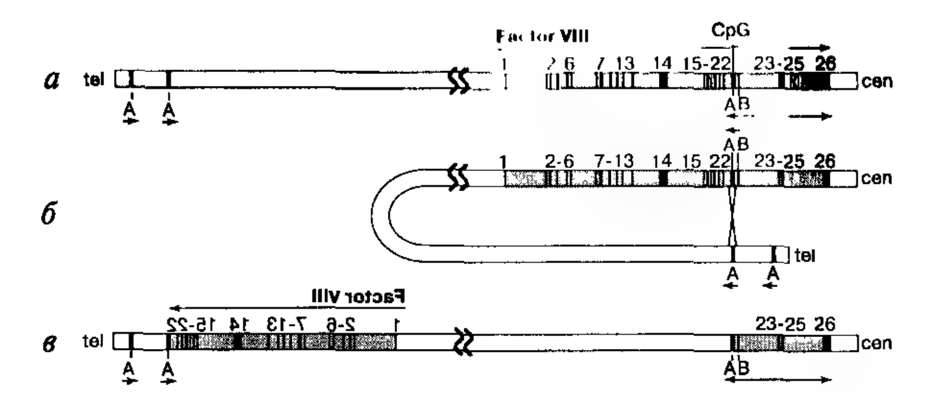


Рис. 21.1. Инверсия вследствие негомологичной рекомбинации в гене гемофилии А. (Из: Ch. R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, 2001)

влению транскрипции), а другой ген (*F8B*), может простираться от 22-го интрона до 23 -26-го экзона (аллели гена вариабельны по протяженности) и транскрибируется в традиционном направлении (рис. 21.1, *а*). Причиной возникновения инверсии в гене F8C является гомологичная рекомбинация между геном *F8A* и его копиями, находящимися на расстоянии нескольких сотен пар нуклеотидов. Схема возникновения такой мутации представлена на рис. 21.1, *б*.

Еще один тип мутаций, наследуемых моногенно, — это *дупликация* определенного участка хромосомы, включающая один или несколько структурных генов. Различают тандемные и инвертированные дупликации. Как правило, они возникают в результате неравного кроссинговера гомологичных хроматид. Считается, что повышению частоты внутригенных делеций или дупликаций способствует присутствие в ДНК прямых и инвертированных повторов, шпилечных структур, квазипалиндромных последовательностей, участков богатых CpG-островками и областей, насыщенных мобильными элементами генома. Наличие этих структур увеличивает риск возникновения негомологичной рекомбинации и «выпетливания» ДНК в процессе репликации при нарушении спаривания родительской и дочерней цепей.

В последние годы у человека описан новый тип мутаций, пока не обнаруженный ни у одного из живых организмов, так называемые, *динамические мутации*. Они характеризуются увеличением количества тринуклеотидных повторов в регуляторной или транскрибируемой частях гена. Число заболеваний, при которых выявляется этот тип патологической мутации, непрерывно растет. Большинство из них — это болезни нервной системы (гл. 22). Необходимо отметить, что в ряде случаев причиной возникновения наследственных заболеваний может быть экспансия более протяженных участков ДНК, содержащих не три, а 12 и более нуклеотидных повторов в транскрибируемой части гена. К настоящему времени описано лишь несколько заболеваний, для которых характерен данный тип мутаций.

Показано, что для различных генов существуют специфические соотношения частот встречаемости тех или иных типов мутаций. При некоторых заболеваниях выявлены так называемые «мажорные» мутации, обнаруживаемые у большинства паци-

ентов. Так, 60% случаев прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшенна обусловлено делециями одного или нескольких экзонов гена, причиной возникновения хореи Гентингтона является исключительно экспансия тринуклеотидных повторов в транслируемой части гена, при спинальной амиотрофии основной тип мутаций – делеции 7–8-экзонов теломерной копии *SMN*-гена. В большинстве генов обнаружены так называемые «горячие точки», – участки, в которых мутации возникают наиболее часто.

В зависимости от характера нарушения функций белкового продукта гена, все мутации условно можно разделить на несколько групп.

1. Мутации, приводящие к потере функции экспрессируемого геном продукта (*loss-of-function*). К этому типу относятся все мутации, нарушающие процессы транскрипции или трансляции.

2. Мутации, приводящие к появлению новой функции белкового продукта гена (*gain-of-function*). Наиболее распространенная мутация этого типа является увеличение количества тринуклеотидных CAG-повторов, кодирующих глутамин, в транскрибируемой части гена. Синтезируемый белок оказывается удлиненным и содержит дополнительный полиглутаминовый участок. Такое изменение структуры белка приводит к изменению его функции и образованию токсичных продуктов, нарушающих нормальные процессы функционирования клеток (подробнее о патогенезе, заболеваний, обусловленных этим типом мутаций см. в гл. 22).

3. Мутации, приводящие к возникновению доминантно-негативного эффекта (*dominant negative effect*), заключающегося в том, что белковый продукт мутантного аллеля гена ингибирует действие продукта нормального аллеля. Особенно часто этот эффект можно наблюдать в случае нарушения функционирования гетеромерных белковых комплексов, возникающего при изменении белковой структуры одной из его полипептидных цепей.

4. Мутации, приводящие к изменению «дозы гена» (*gene dosage effect*). Такой феномен возникает, прежде всего, при дупликации или делеции участка ДНК, содержащего тот или иной ген.

Более подробно механизм возникновения мутаций и особенности их фенотипических проявлений описываются в разделах, посвященных клинико-генетическим характеристикам вызываемых этими мутациями наследственных заболеваний.

21.2.1. СХЕМА ЗАПИСИ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ ЧЕЛОВЕКА

Разработана специальная номенклатура унифицированной записи мутаций в генах и замены аминокислотной последовательности в белке. При наличии точковых мутаций, приводящих к замене одной аминокислоты в полипептидной цепи, чаще указывают изменение аминокислотной последовательности. При обозначении мутаций сплайсинга, делеций, инсерций и полиморфизмов, а также мутаций, возникающих в нетранслируемых участках генов, используют систему записи нуклеотидов. Принцип нумерации нуклеотидов следующий: номера присваиваются только тем нуклеотидам, которые входят в состав экзонов, т.е. №1 – соответствует первому нуклеотиду 1-го экзона. Для нумерации нуклеотидов в интронах необходимо определить номер ближайшего нуклеотида экзона и расположение интересую-

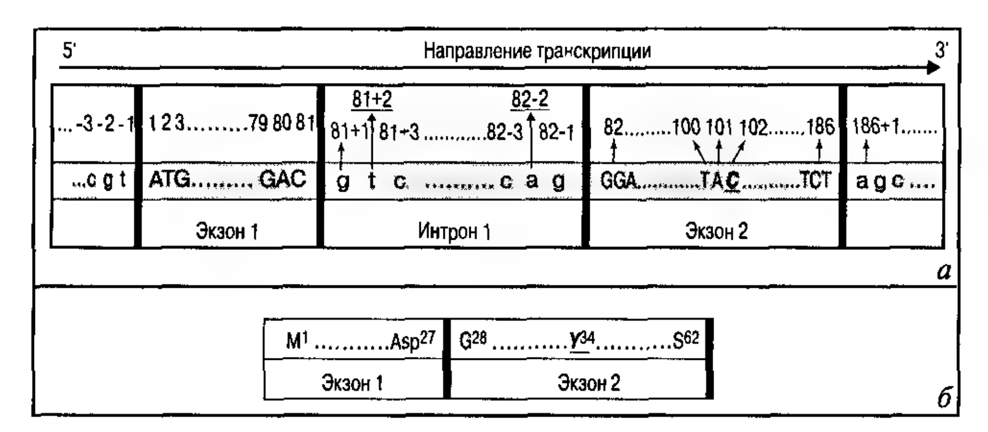


Рис. 21.2. Принципы нумерации нуклеотидов в гене и аминокислот в полипептидной цепи.

Замена TAC на TAG или C на G в 102-ом положении экзона приведет к замене тирозина (Y) в 34-ом положении пептидной цепи на стоп-сигнал: Y34X

щих нас нуклеотидов по отношению к 5′- и 3′-концам ДНК. Нуклеотид интрона, находящийся против рамки считывания по отношению к экзону, т.е. со стороны 5′-конца ДНК, записывается со знаком «–», например 982 – 1, а находящийся вдоль рамки считывания (со стороны 3′-конца) – со знаком «+», например, 81 + 1. При использовании буквенных обозначений нуклеотиды экзонов записываются заглавными буквами, а интронов – прописными. Схема записи и нумерации нуклеотидов в гене представлена на рис. 21.2.

Каждой из 20 аминокислот соответствует одно- и трехбуквенный символы, представленные в табл. 21.2.

При обозначении аминокислотных замен слева записывается нормальный вариант аминокислоты, справа – появившийся в результате мутации, а между ними обозначается место этой замены. Например, запись M366V означает замену метионина на валин в 366 положении полипептидной цепи, произошедшую в результате миссенс-мутации в гене. Это же обозначение может быть трехбуквенным и записываться как Met366Val. Для обозначения однонуклеотидных замен используют буквы A,C,T,G и запись может выглядеть следующим образом 1096A > G.

В том случае, когда происходит нонсенс-мутация и синтез полипептидной цепи обрывается, место его остановки обозначают буквой X. Например, запись Q23X, означает, что в результате мутации в 23-ем кодоне, кодирующем глутамин возник стоп-сигнал. Отсутствие одной или нескольких аминокислот в белковой молекуле обозначают значком Δ. Например, запись Δ F508 означает отсутствие аминокислоты фенилаланина в 508-ом положении белка.

При наличии делеции или инсерции одного или двух нуклеотидов приводится их буквенное обозначение, а при делеции или инсерции трех и более нуклеотидов приводится их количество. Например, запись 345delA означает, что в 345-ом положении произошла делеция нуклеотида A, а запись 546del24 означает, что произошла делеция 24 нуклеотидов, начинающаяся с 546-го нуклеотида.

Таблица 21.2. **Одно- и трехбуквенные символы аминокислот**

Аминокислота	Трехбуквенное обозначение	Однобуквенное обозначение
Аланин	Ala	(A)
Аргинин	Arg	(R)
Аспарагин	Asn	(N)
Аспарагиновая кислота	Asp	(D)
Валин	Val	(V)
Глутамин	Glu	(Q)
Глутаминовая кислота	Gln	(E)
Глицин	Gly	(G)
Гистидин	His	(H)
Изолейцин	Ile	(I)
Лейцин	Leu	(L)
Лизин	Lys	(K)
Метионин	Met	(M)
Пролин	Pro	(P)
Серин	Ser	(S)
Тирозин	Tyr	(Y)
Треонин	Thr	(T)
Триптофан	Trp	(W)
Фенилаланин	Phe	(F)
Цистеин	Cys	(C)

Инсерции обозначают символом ins и записывают следующим образом. Внача указывают интервал между нуклеотидами, в котором произошло встраивание се мента, а затем обозначение сегмента. Например, 234-235insT означает, что меж 234- и 235-м нуклеотидами произошла вставка Т.

В случае мутаций сплайсинга запись начинают с номера крайнего нуклеотида экзоне, ближайшем к мутации, затем указывают номер нуклеотида и характер ну леотидной замены. Например, запись 621 + 1g → t означает, что в первом основани интрона, который расположен за экзоном, заканчивающимся 621-м нуклеотидом произошла замена g на t.

Динамические мутации, обусловленные экспансией тринуклеотидных повторов, з писываются следующим образом. Вначале указывают номер нуклеотида с которого начи нается экспансия повтора, затем описывают тип его тринуклеотидной последовательно сти и приводят количество повторов. Например, запись 28(CTG)200 означает, что, начи ная с 28-го нуклеотида, выявлено 200 CTG-тринуклеотидных повторов.

21.3. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ И КЛИНИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ МОНОГЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Для большинства моногенных наследственных заболеваний характерна генетиче ская гетерогенность. Это означает, что одно и то же по клиническим проявления

:вание может быть обусловлено различными генетическими дефектами. Это быть мутации в нескольких генах (**локусная гетерогенность**), или разные мута- одном и том же гене (***аллельная гетерогенность***).

іентичность клинических проявлений наследственных заболеваний при нали- окусной гетерогенности обусловлена, прежде всего, единством патогенетиче- механизмов. При этом белковые продукты генов могут функционировать в од- тех же тканях в качестве структурных белков, имеющих сходные функции, вхо- в состав ферментных систем, обеспечивающих различные этапы единого пути олизма субстратов или являться транспортными белками для определенной ы ферментных систем.

имером локусной гетерогенности служит *наследственная полинейропатия Де- ла Сотта*, характеризующаяся врожденной демиелинизацией перифериче- нервов. Клинические проявления этого заболевания возникают при наличии ции в одном из четырех генов:

гене периферического белка миелина (PMP22), локализованном в области хро- мы 17 p11.2-12;

гене основного белка миелина (Po), картированном на хромосоме 1;

гене раннего белка миелина (EGR2), расположенном на хромосоме 10;

гене периаксина (PRX), обнаруженном на хромосоме 19.

одство клинических проявлений этих различных генетических вариантов обу- сно единством их патогенетических механизмов. Показано, что все четыре ге- нетственные за болезнь, экспрессируются в миелиновой оболочке перифери- х нервов, нарушение функционирования которой приводит к появлению ичных симптомов врожденной полинейропатии. Еще одним примером локус- етерогенности может служить группа наследственных заболеваний сетчатки – ентных ретинитов, основным клиническим проявлением которых является ессирующее снижение остроты зрения, обусловленное нарушениями процес- оторецепции. В настоящее время показано существование, по крайней мере 24 чных генов, мутации в которых приводят к нарушению функционирования вых продуктов, участвующих в процессе фоторецепции в качестве структурных в, ферментов и коферментов.

аличие аллельной гетерогенности характерно практически для всех моногенных на- твенных заболеваний. В большинстве случаев наличие различных мутаций в одном же гене приводит к возникновению заболеваний со сходной клинической симпто- кой, с небольшими вариациями в степени генерализации процесса и тяжести тече- При этом фенотипическое разнообразие обусловлено следующими причинами:

разным механизмом действия мутаций на процессы трансляции белкового укта (одни мутации могут вызывать полное отсутствие белка, другие приводят к ению его количества, а третьи обусловливают изменение размеров мРНК);

наличием одного или нескольких генов-модификаторов, регулирующих экс- сию мутантного гена;

различиями в степени нарушения функций белка при мутациях, изменяющих окислотную последовательность отдельных доменов.

Іоказано, что клинические проявления заболеваний, вызванных миссенс-мута- ии, как правило, менее выражены, чем в случае нонсенс-мутаций или сплайсин-

говых мутаций. Иногда у больных, с аутосомно-рецессивными наследственными заболеваниями обнаруживаются различные мутантные аллели одного и того же гена. Клиническая картина у таких компаунд-гетерозигот отличается по тяжести от клинической картины у гомозигот по каждому из аллелей.

Однако, в ряде случаев, мутации в различных участках гена могут обусловливать возникновение совершенно разных болезней. В качестве примера можно привести два заболевания — *спинально-бульбарную мышечную атрофию Кеннеди и синдром тестикулярной феминизации*, обусловленные различными мутациями в гене андрогенового рецептора, картированного на Х-хромосоме. Первое заболевание связано с поражением двигательных нейронов спинного мозга и ствола мозга и проявляется мышечной слабостью и атрофией мышц плечевого пояса, нарушением глотаиия и дыхания, гинекомастией и рядом других симптомов. Тип мутаций в гене при этой форме спинальной амиотрофии относится к группе «динамических» и характеризуется увеличением количества тринуклеотидных CAG-повторов в первом экзоне гена. Второе заболевание относится к группе синдромов нарушения половой дифференцировки, основные проявления которого связаны с нечувствительностью андрогеновых рецепторов к дигидротестостерону. При этом у человека с мужским кариотипом (46, XY) наружные половые органы сформированы по женскому типу, однако, влагалище заканчивается слепо, а матка отсутствует. Основной тип мутации в гене при этой патологии – однонуклеотидные точковые замены, приводящие к инактивации андрогенового рецептора.

21.4. ПАТОГЕНЕЗ МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Патогенез моногенных заболеваний многообразен, что связано с различиями функций белковых продуктов, нарушенных в результате мутаций. Пострадать могут функции структурных, транспортных, рецепторных и других вирусных белков. Кроме того известно, что одни белки являются тканеспецифичными и экспрессируются в определенных клетках организма (например, глобиновые белки – только в эритроцитах, а другие (например, коллагеновые белки) широко представлены в различных органах и тканях. Естественно, что клинические проявления мутаций в тканеспецифичных генах ограничены определенными тканями, в то время как при мутациях в генах широко экспрессирующихся белков наблюдается мультисистемность поражения.

Разнообразие клинических проявлений наследственного заболевания может быть связано со специфическими функциями участвующего в патогенезе белкового продукта. Белки могут играть роль ферментов, гормонов, структурных компонентов клеточного матрикса или ионных каналов, транскрипционных факторов, трасмембранных переносчиков, клеточных рецепторов, компонентов сигнальной трансдукции, иммуноглобулинов, а также выполнять другие функции. Это приводит к тому, что патогенез возникновения клинических признаков при отдельных нозологических формах в значительной степени уникален, однако, существуют и некоторые общие закономерности развития патологии. В настоящее время появилась тенденция

к выделению отдельных групп заболеваний на основании сходства патогенетических механизмов. Так, в качестве отдельной группы рассматривают каналопатии, возникновение которых обусловлено нарушением функционирования ионных каналов (калиевых, натриевых, кальциевых и хлорных) в мембране мышечных, нервных и глиальных клеток; гемоглобинопатии, возникающие при нарушении функций молекулы гемоглобина; болезни, связанные с нарушением сигнальной трансдукции, клеточных рецепторов, структуры коллагена (коллагенопатии) и др. Наиболее хорошо изучен патогенез наследственных болезней обмена, при которых известны структура, функции и пути метаболизма белковых продуктов гена. Большинство наследственных болезней обмена – это ферментопатии, при которых нарушаются процессы расщепления и утилизации определенных продуктов. К сожалению, классификация наследственных болезней на основании сходства патогенетических механизмов не всегда оказывается целесообразной и удобной для врача, так как в одну группу могут попасть заболевания, имеющие различные клинические проявления и, в соответствии с клинической систематикой, рассматриваемые в различных классах. Так, например, к группе болезней ионных каналов относят различные варианты наследственных эпилепсий, миотонии и пароксизмальные миоплегии, имеющие совершенно различные клинические проявления. С другой стороны, выделение заболеваний на основе общности патогенеза, облегчает процесс разработки патогенетической терапии, направленной на коррекцию общих механизмов развития болезней. В рамках данного руководства, безусловно, невозможно проанализировать все известные на сегодняшний день молекулярные механизмы наследственных патологий, но часть из них будет рассмотрена в разделах, посвященных конкретным моногенным болезням.

21.5. КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МОНОГЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ С МЕНДЕЛЕВСКИМ НАСЛЕДОВАНИЕМ

21.5.1. АУТОСОМНО-ДОМИНАНТНЫЕ МОНОГЕННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

21.5.1.1. ХАРАКТЕРИСТИКА АУТОСОМНО-ДОМИНАНТНОГО ТИПА НАСЛЕДОВАНИЯ

Аутосомно-доминантный тип наследования характеризуется: 1) проявлением заболевания у гетеро- и гомозигот по патологической мутации; 2) передачей мутантного гена от родителей к детям обоего пола с вероятностью 50%. Следует также учитывать

некоторые особенности аутосомно-доминантного типа наследования заболевания в некоторых семьях: 1) неполную пенетрантность и варьирующую экспрессивность мутантного аллеля при его сегрегации в ряду поколений; 2) существование антиципации, то есть, нарастания тяжести заболевания у больных последующих поколений.

Механизм доминантности, обусловливающий появление клинических симптомов при наличии лишь одной копии мутантного аллеля, до конца не расшифрован. Эффект доминирования определенного аллеля гена может возникать в том случае, если его продукт регулирует комплекс метаболических путей, служит ключевым ферментом в ряду биохимических реакций или играет роль мембранного рецептора. При ряде заболеваний доминантный эффект может быть обусловлен нарушением синтеза белка, который участвует в формировании комплекса структур (например, белков коллагена I типа, см. гл. 21).

Варьирующая экспрессивность гена проявляется различной тяжестью клинических симптомов болезни у пораженных членов родословной. Так, у части больных могут наблюдаться стертые и абортивные формы заболевания, для обнаружения которых необходимо использовать дополнительные методы обследования, в то время как у других – наблюдаются тяжелые клинические проявления.

Неполная пенетрантность гена выявляется при анализе родословных при наличии так называемого «пропуска поколений», когда передача заболевания может осуществляться через клинически здорового носителя патологического гена, который он унаследовал от больного родителя. При наличии неполной пенетрантности мутантного гена риск возникновения заболевания у потомков пораженного родителя может быть модифицирован и рассчитан по формуле: $p \times P$, где p – априорная вероятность возникновения заболевания, предполагаемая на основе менделевских закономерностей (50% при аутосомно-доминантном типе наследования), а P – коэффициент пенетрантности. Показатель пенетрантности может быть суммарным, полученным при анализе большого числа информативных родословных или рассчитанным на основании изучения родословной единственной семьи. В последнем случае он рассчитывается на основании соотношения заболевших носителей мутантного гена к общему количеству носителей (заболевших и не заболевших) среди членов одной семьи. Примеры родословных при заболеваниях с полной и неполной пенетрантностью представлены на рис. 21.3.

Механизмы возникновения антиципации недостаточно ясны, однако один из них был расшифрован при изучении болезней, обусловленных экспансией тринуклеотидных повторов. Эта группа заболеваний описана в гл. 22.

Необходимо иметь в виду, что только часть случаев заболеваний с аутосомно-доминантным типом наследования обусловлена передачей патологического гена родителями, имеющими этот ген в каждой клетке организма. Определенная доля аутосомно-доминантных заболеваний обязана своим появлением вновь возникшей мутации в единственной половой клетке одного из родителей. Для каждого заболевания количество случаев, обусловленных новой мутацией и сегрегацией мутантного гена в ряду поколений варьирует. Их соотношение связано, прежде всего, с различиями в приспособленности больного индивида. Для заболеваний, начинающихся в старшем возрасте, не приводящих к выраженной инвалидизации, не сопровождающихся значительными пороками развития, снижением продолжительности жизни и

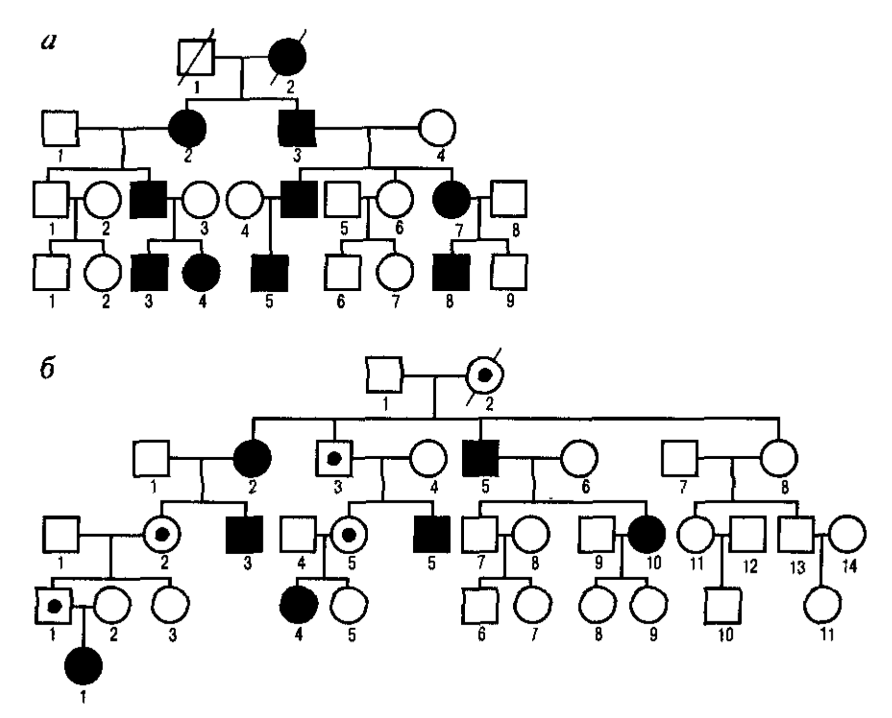


Рис. 21.3. Родословная с АД типом наследования заболевания при полной (*а*) и неполной (*б*) пенетрантности гена

фертильности больных, наибольшее количество случаев, как правило, являются сегрегирующими. Если приспособленность больных в силу ряда причин снижена (раннее начало, быстрая инвалидизация, тяжелые врожденные пороки развития, снижение продолжительности жизни больного), преобладающее число случаев заболевания обусловлено вновь возникшей мутацией (de novo). Так, при ахондроплазии, характерный признак которой – непропорциональная карликовость, 80% случаев возникает в результате мутации de novo в гаметах родителей. Мужчины, страдающие этим заболеванием как правило бесплодны, фертильность пораженных женщин тоже снижена. С другой стороны основное количество случаев *хореи Гентингтона* – тяжелого нейродегенеративного заболевания, сопровождающегося выраженными гиперкинезами, деменцией и психическими нарушениями – являются сегрегирующими, что связано с поздним возрастом начала болезни и нормальной фертильностью носителей гена на доклинической стадии. Важно отметить, что эта закономерность прослеживается не всегда. Так при ряде заболеваний с относительно доброкачественным течением может наблюдаться преобладание случаев, обусловленных новой мутацией, что объясняется повышенной частотой мутирования того или иного гена. К таким заболеваниям относится, например, наследственная *моторно-сенсорная нейропатия IA-типа*, для которой характерна умеренная выраженность клинических симптомов, наличие большого количества стертых форм болезни и неполная

пенетрантность. Заболевание не приводит к выраженной инвалидизации и с... нию плодовитости больных, однако, не менее 70% случаев этого заболевани... словлено мутацией de novo. Еще одна интересная особенность этой болезни ... чается в довольно редком типе мутации – дупликации хромосомной области, с... жащей дозочувствительный ген. В настоящее время известно мало заболеваний... никновение которых обусловлено дупликациями того или иного гена. Показан... повышение уровня белкового продукта таких генов приводит к возникновени... нических симптомов в результате нарушения гомеостаза. На примере наследс... ной моторно-сенсорной нейропатии 1А-типа продемонстрируем один из возмо... механизмов возникновения эффекта доминантности при наличие мутации в ге... зиготном состоянии.

21.5.1.2 НАСЛЕДСТВЕНАЯ МОТОРНО-СЕНСОРНАЯ НЕЙРОПАТИЯ 1А-ТИПА (OMIM: 118220).

Заболевание относится к группе периферических полинейропатий, основные кли... нические проявления которых обусловлены поражением миелиновой оболочки и... осевых цилиндров периферических нервов. Первое заболевание этой группы – не... ральная амиотрофия, или *болезнь Шарко–Мари — Тута* – было описано в 1886 году. ... настоящее время идентифицировано 23 локуса наследственных полинейропатий... их поиск продолжается. Наследственная моторно-сенсорная нейропатия 1А ти... (НМСН-1А) относится к наиболее распространенным формам, так называемых, д... миелинизирующих или гипертрофических наследственных полинейропатий, хара... теризующихся нарушением структуры и функции миелиновой оболочки нер... Этиологическим фактором НМСН-1А служит тандемная 1,5 Mb-дупликация в обл... сти хромосомы 17p11.2-12. В результате неравного кроссинговера между высоко... мологичными теломерным и центромерным повторами образуются две хромосомы... одна с дупликацией, а другая – с реципрокной к ней делецией (рис. 21.4). Носители д... пликации демонстрируют симптомы НМСН 1А-типа, носители делеции страда... нейропатией со склонностью к параличам от сдавления. Доказано, что критическ... фактором для возникновения симптомов НМСН 1А-типа является увеличение до... гена PMP 22, кодирующего один из миелиновых белков. Этот белок, состоит из 1... аминокислот, экспрессируется в шванновских клетках и составляет 2–5% от вс... белков периферического миелина. Компактный миелин периферических нервов о... разован множеством слоев клеточной мембраны шванновской клетки, закручен... вокруг аксона (рис. 21.5, *а*, *б*, *в*, *г*).

Увеличение экспрессии белка PMP22 приводит к нарушению миелинизации не... вных волокон. Шванновские клетки не образуют многослойный компактный ми... лин, а группируются вокруг осевого цилиндра, наслаиваются друг на друга, подоб... чешуйкам луковицы (рис. 21.5, *д*). Это сопровождается пролиферацией эндоне... ральных соединительнотканных элементов, что приводит к существенному утолщ... нию нерва и нарушению процессов проведения электрического импульса. Итог... этих нарушений является замедление электрической импульсации и трофики мыш...

а

Нормальный кроссинговер

REP1 PMP22 REP2

REP1 PMP22 REP2

б

Неправильное спаривание и «выпетливание»

PMP22 REP2

REP1

REP2

REP1

PMP22

в

Хромосомы: с НМСН1А-дупликацией

REP1 PMP22 REP2/1 PMP22 REP2

REP1/2

с ННПС-делецией

Рис. 21.4. Механизм образования дупликации в результате неравного кроссинговера при НМСН-1А

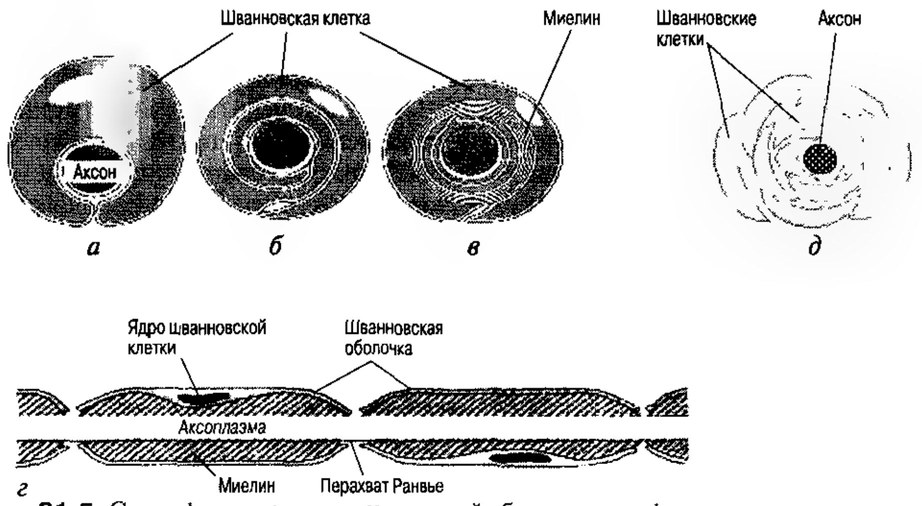


Рис. 21.5. Схема формирования миелиновой оболочки периферического нерва в норме (*а*, *б*, *в* – поперечный разрез, *г* – продольный разрез) и у больных с НМСН-1А (*д*) (Из: Мерсиянова И.В., 2001)

Рис. 21.6. Молекулярно-генетическая диагностика НМСН 1А-типа. (Из: ООО «Центр Молекулярной генетики»/ Лаборатория ДНК-диагностики МГНЦ РАМН, 2001)

На электрофореграмме представлены различные варианты сочетаний фрагментов, которые выявляются после ПЦР с использованием праймеров 17dup5 и 17dup4 у больных невральной амиотрофией Шарко-Мари-Тута 1А-типа, имеющих дупликацию, и в контрольных образцах Дорожка 1 маркер *молекулярной массы λ/PstI;*

Дупликация выявлена в следующих случаях:

дорожка 2 – двойная доза нижнего аллеля относительно верхнего по обоим маркерам (дупликация),

дорожка 4, 5, 11, 13 три аллеля по одному из маркеров и два аллеля с соотношением интенсивностей полос 1:2 по другому маркеру;

дорожка 9 два аллеля с соотношением полос 1 2;

дорожка 10 – три аллеля по обоим маркерам.

На *дорожках* 3, *6*, *8*, *12* *нет* дупликации (*равная интенсивность верхнего и нижнего аллелей по* обоим маркерам); а на дорожке 7 дупликация исключается (так как по одному из маркеров наблюдается 2 аллеля равной интенсивности (гетерозигота), а по другому – один аллель (гомозигота))

Клиническая картина характеризуется сочетанием слабости и атрофии мышц дистальных отделов рук и ног, с последующей их деформацией, расстройствами чувствительности, сухожильной гипо- или арефлексией. Достаточно часто к указанным симптомам поражения периферических нервов присоединяются расстройства координации.

Диагностика заболевания основана на выявлении клинических симптомов поражения периферических нервов, снижения скоростей проведения импульса по периферическим нервам ниже 38 м/сек и обнаружении дупликации в ходе молекулярно-генетического анализа. В связи с выраженной генетической гетерогенностью и отсутствием существенного клинического полиморфизма в группе наследственных демиелинизирующих полинейропатий ведущее значение в диагностике отдельных генетических вариантов принадлежит ДНК-анализу. Пример молекулярно-генетической диагностики НМСН 1А-типа представлен на рис. 21.6.

Для демонстрации этиопатогенетических особенностей других заболеваний с аутосомно-доминантным типом наследования приводим клинико-генетические характеристики ряда нозологических форм из группы болезней ионных каналов и коллагенопатий.

21.5.1.3. БОЛЕЗНИ ИОННЫХ КАНАЛОВ

В последнее десятилетие описан ряд заболеваний, возникновение которых обусловлено мутациями в генах белковых субъединиц натриевых, калиевых, кальциевых и хлорных ионных каналов. Эта группа заболеваний получила название «болезни ионных каналов» (БИК). Наибольшее количество нозологических форм представлено наследственными болезнями нервной системы с аутосомно-доминантным типом наследования, при которых нарушаются механизмы проницаемости и возбудимости клеточных мембран мышечного волокна или нейронов. Нарушение функционирования ионных каналов в мембране мышечного волокна приводит к появлению клинических симптомов периодического паралича и миотоний, а патология этих каналов в мембране нервных клеток обусловливает появление различных вариантов наследственных эпилепсий и атаксий. Все вольтаж-зависимые ионные каналы имеют эволюционное родство и сходную структуру. Они состоят из шести трансмембранных сегментов, связанных экстрацеллюлярной и интрацеллюлярной петлями и формирующих один домен. Четвертый трансмембранный сегмент каждого домена содержит несколько положительно заряженных аминокислот, которые чувствительны к градиенту напряжения на мембране. Другой критический регион представлен погруженной в мембрану экстрацеллюлярной петлей между пятым и шестым сегментом. Согласованное действие этих петель всех четырех доменов формирует пору ионного канала. Аминокислоты этих петель детерминируют селективное проникновение через канал только определенных ионов. В калиевых каналах присутствует один такой домен, а в кальциевых и натриевых каналах четыре домена формируют одну α-субъединицу. Схема строения натриевого канала мышечной мембраны представлена на рис. 21.7.

Натриевый канал содержит две субъединицы – α и β. α-Субъединица состоит из четырех повторяющихся доменов, связанных как с экстрацеллюлярным, так и с интрацеллюлярным матриксом. Каждый домен в свою очередь, подразделен на шесть трансмембранных сегментов. Четвертый сегмент каждого домена содержит несколь-

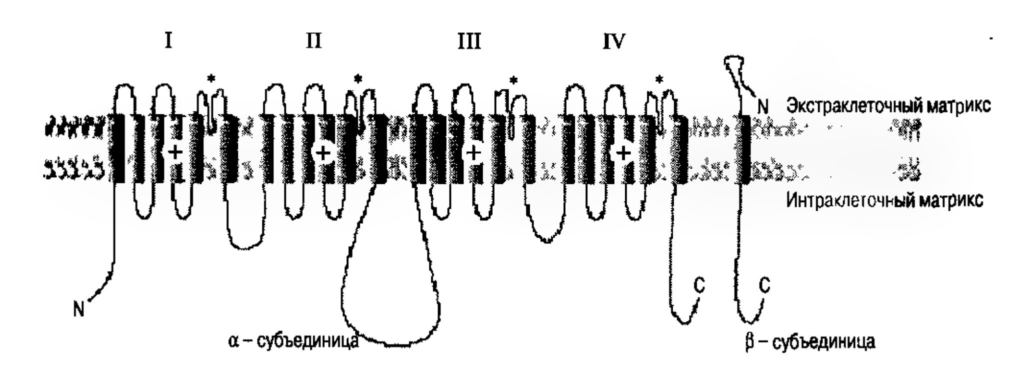


Рис. 21.7. Строение натриевого канала мембраны мышечного волокна. (Из: http: // www.neuro.wustl.edu/neuromuscle/index.html)

ко положительно заряженных аминокислот, которые чувствительны к градиенту потенциала на мембране мышечного волокна. Другой критической областью натриевого канала является участок между 5- и 6-ым сегментом, где находится пора канала с избирательной проницаемостью для отдельных ионов. Нарушение в работе ионных каналов может быть основой наследственного заболевания. Впервые это было показано Фонтейном с соавт. в 1990 году: оказалось, что периодический гиперкалиемический паралич коррелирует с неправильным функционированием натриевых каналов. Наиболее изучена группа заболеваний, обусловленных нарушением функционирования именно натриевых каналов. Помимо гиперкалиемического периодического паралича, она включает несколько нозологических форм: врожденную парамиотонию Эйленбурга, ацетазол-зависимую миотонию и врожденную миастению. Для всех заболеваний этой группы характерен приступообразный характер течения. Рассмотрим более подробно гиперкалиемический периодический паралич.

Периодический гиперкалиемический паралич (OMIM:170500). Заболевание впервые описано И. Гамсторпом в 1956 г. Его этиологическим фактором являются мутации, нарушающие функционирование гена *SCN4A*. Ген картирован на хромосоме 17q23.1-q25.3 и кодирует белок α-субъединицы натриевого канала, состоящий из 1836 аминокислот. Основной тип мутаций – точковые однонуклеотидные замены, обусловливающие аномалии во 2-ом и 4-ом доменах белка. Патогенетический механизм заболевания заключается в инактивации натриевых каналов скелетных мышц, в результате чего ионы натрия продолжают просачиваться внутрь мышечного волокна. В норме натрий попадает в мышечное волокно после деполяризации мембраны, которая приводит к быстрому открытию натриевого канала из-за конформационных изменений вольтаж-зависимого 4-го сегмента. Натриевый поток устремляется внутрь волокна, а поток ионов калия движется в противоположном направлении – в межклеточное пространство, обусловливая состояние гиперкалиемии. Прохождение натрия внутрь мембраны сочетается с нарастанием амплитуды потенциала действия и быстрым закрытием канала даже при персистировании процесса деполяризации.

В интактных мышцах инактивация канала наступает после падения амплитуды потенциала действия. Выход канала из стадии инактивации происходит только после наступления реполяризации мембраны.

В результате мутации в гене нарушается функционирование α-субъединицы натриевого канала, потенциал действия пролонгируется и нарушается процесс реполяризации мембраны мышечного волокна. Умеренная деполяризация мембраны (от 5 до 20 мв) обусловливает миотонию, а выраженная деполяризация (более 20 мв) приводит к возникновению мышечной слабости. Этапы патогенеза заболевания представляются следующим образом: увеличение концентрации внеклеточного калия → деполяризация мембраны мышечного волокна → открытие натриевых каналов → персистирование внутриклеточного потока натрия и внеклеточного потока калия → поддержание деполяризации мышечной мембраны → инактивация нормальных натриевых каналов → снижение электрической возбудимости мышечной мембраны.

Первые признаки заболевания возникают в возрасте от 5 до 20 лет и характеризуются приступами выраженной мышечной слабости и адинамии, в течение которых больные теряют способность двигаться. Характерная особенность этой формы пароксизмальной миоплегии – повышение уровня калия в сыворотке крови и экскреция

его с мочой во время приступа и снижение уровня натрия. В большинстве случаев приступы возникают днем и провоцируются голоданием, употреблением в пищу продуктов богатых калием, а также лекарственных препаратов, содержащих калий, физическими нагрузками и переохлаждением. Выделяют три типа паралича: в комбинации с миотонией, без миотонии и с признаками парамиотонии. Зачастую возникновению приступа предшествуют парестезии в области лица и дистальных отделов конечностей. Сухожильные рефлексы во время приступа отсутствуют. У большинства больных приступ сопровождается выраженными вегетативными нарушениями – артериальной гипертензией, потливостью, тахикардией, аритмиями. Изменения со стороны сердечно-сосудистой системы могут достигать значительной выраженности и даже приводить к внезапной смерти. После окончания приступа у ряда больных отмечается болезненность мышц и усиленный диурез. По мере развития заболевания, особенно у больных в возрасте старше 40 лет, частота и выраженность приступов уменьшается. Диагностика заболевания осуществляется на основании клинической картины, определения уровня калия в крови во время приступа, а также в результате проведения молекулярно-генетического анализа, направленного на обнаружение мутаций в гене *SCN4A*. Для данного заболевания возможна дородовая ДНК-диагностика.

21.5.1.4. КОЛЛАГЕНОПАТИИ

Коллагенопатии – большая группа наследственных заболеваний, которые обусловлены мутациями, нарушающими синтез и распад коллагенов – важнейших структурных компонентов соединительной ткани. Коллагены составляют примерно треть всей массы белка в организме человека. Около 40% коллагена находится в коже, 50% – в структурах скелета и 10% – в строме внутренних органов. Коллагеновые белки состоят из трех скрученных полипептидных α-цепей содержащих по 1000 аминокислот, которые формируют трехгранную структуру (рис. 21.8).

Существует несколько типов α-цепей, различающихся по составу аминокислот. Различные типы коллагенов могут содержать как одинаковые, так и различные α-цепи, то есть, быть гомо- или гетеромерными. В настоящее время идентифицировано 19 типов коллагенов. Они формируются более чем 30 белками, гены которых локализованны на 14 хромосомах.

Коллагены 1-, 2-, 3-, 5- и 9-го типа относятся к фибриллярным коллагенам, широко представленным во всех соединительнотканных структурах, коллаген 4-го типа

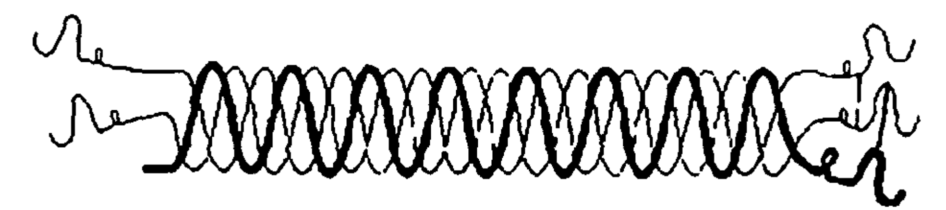


Рис. 21.8. Строение коллагенов

локализован в базальной мембране, 8- и 10-й типы коллагенов формируют структуры сетчатки и хрусталика глаза, 11-,12- и 14-й типы коллагенов входят в структуру больших коллагеновых фибрилл различных тканей. Коллаген 6-го типа образует микрофибриллы мягких тканей и хрящей, коллаген 7-го типа играет роль якоря и осуществляет взаимосвязь структур дермы и эпидермиса, коллагены 13- и 17-го типа являются трансмембранными, а 15- и 18-го – входят в состав эндотелия. Показано, что в структуре коллагеновых α-цепей каждая третья аминокислота является глицином и, таким образом формула молекулы коллагена может быть записана как (X-Y-Gly)n, где X и Y аминокислоты – не- глицин. Различия в структуре α-цепей обусловлены как количеством этих мотивов, так и составом аминокислот X и Y. Образование зрелого коллагена включает несколько стадий, которые проходят как внутри, так и вне клетки. Сразу после синтеза коллагеновых α-цепей на рибосомах они подвергаются внутриклеточной посттрансляционной модификации, в ходе которой происходит гидроксилирование, образование дисульфидных связей между различными α-цепями и их скручивание в спиралевидную структуру. В биосинтезе коллагена принимают участие различные ферменты, основные из которых: лизилгидроксилаза, гликозилтрансфераза, сульфотрансфераза, лизилоксидаза. В результате этих и некоторых других процессов образуется зрелая молекула проколлагена, которая секретируется во внеклеточное пространство. На плазматической мембране происходит удаление концевых пропептидов под действием специфических протеаз, в результате чего образуется тропоколлаген – предшественник зрелого коллагена. Окончательное формирование основных структур соединительной ткани – фибрилл – из молекул проколлагена происходит вне клетки и представляет собой многоступенчатый процесс, контролируемый различными генами. Из всего вышесказанного следует, что возникновение коллагеновых болезней может быть обусловлено мутациями генов, контролирующих процессы транскрипции, трансляции, процессинга, транспорта с помощью аппарата Гольджи, а также тех генов, которые задействованы в формировании различных типов коллагенов. Можно выделить две группы таких мутаций: мутации, приводящие к уменьшению количества полипептидных цепей и мутации, нарушающие их взаимодействие при формировании трехмерной структуры. Особенно значительные нарушения в структуре и функции тканей богатых коллагеном вызывают мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания, а также замене глицина в полипептидной молекуле, который имеет существенное значение для правильного формирования тройной коллагеновой спирали. В табл. 21.3. представлены данные о локализации основных генов, имеющих отношение к возникновению коллагенопатий.

Симптоматика коллагенопатий разнообразна. В настоящее время хорошо изучены клинико-генетические характеристики нескольких заболеваний, прежде всего, *синдрома Элерса–Данло, несовершенного* остеогенеза и миопатии Бетлема. Для демонстрации особенностей клинических проявлений заболеваний этой группы приводим клинико-генетические характеристики одного из наиболее распространенных заболеваний с аутосомно-доминантным типом наследования – несовершенного остеогенеза.

Несовершенный остеогенез (НО) (OMIM:162200; 162210; 162220; 259420). Это одно из наиболее распространенных заболеваний с аутосомно-доминантным типом

Таблица 21.3. **Молекулярно-генетическая характеристика основных клинических вариантов коллагенопатий**

Тип	Ген	Локализация	Заболевания
1	*COL1A1*	17q21.31-22	Несовершенный остеогенез
	COL1A2	7q22.1	Синдром Элерса–Данло 2 и 7 типов
2	*COL2A1*	12q13.11-13.2	Синдром Стиклера, синдром Книста
3	*COL3A1*	2q31	Синдром Элерса-Данло 4 типа
4	*COL4A3*	2q36-37	Синдром Альпорта АР
	COL4A5	Xq22	Синдром Альпорта ХР
5	*COL5A1*	9q34.2-34.3	Синдром Элерса–Данло 1 и 2 типов
	COL5A2	2q31	Синдром Элерса–Данло 1 типа
6	*COL6A1*	21q22.3	Миопатия Бетлема
7	*COL7A1*	3p21.3	Булезный эпидермолиз
9	*COL9A1*	6q13	Множественная эпифизарная дисплазия
11	*COL11A1*	1p21	Синдром Стиклера

наследования, встречающееся с частотой 1:10000 – 1:25000 новорожденных. Выделяют несколько клинических вариантов, которые возникают в результате различных мутаций в генах *COL1A1* и *COL2A1*. Эти гены кодируют образование двух полипептидных цепей проколлагенов pro-α1 и pro-α2, входящих в состав коллагена 1-го типа. Наиболее тяжелые клинические проявления обусловливают мутации со сдвигом рамки считывания, захватывающие 48-й экзон гена. В этом случае образуется нестабильная мРНК, не обеспечивающая нормальное прохождение процессов трансляции. Наиболее часто выделяют четыре клинических варианта НО.

НО-1 всегда наследуется аутосомно-доминантно и характеризуется триадой клинических признаков – голубыми склерами, множественными переломами костей, возникающими при минимальной травматизации, и глухотой, возникающей примерно у половины больных. В зависимости от наличия или отсутствия несовершенного дентиногенеза в рамках этого типа выделяют два подтипа – 1А, при котором возникает аномалия дентина, и 1В, при котором зубы не поражены. Переломы костей возникают в детском возрасте, главным образом в трубчатых костях. Однако в ряде случаев могут наблюдаться и в костях запястья и плюсневых костях. Переломы, как правило, быстро срастаются и не приводят к возникновению деформации костей. Рост больных этим вариантом НО не изменен. Вероятность появления переломов значительно уменьшается по мере роста больных и резко снижается к пубертатному возрасту. Увеличение риска переломов возникает лишь в пожилом возрасте, и у женщин связано с менопаузой. На рентгенограмме обычно не выявляется патология костной ткани, остеопения обнаруживается только при проведении денситометрии. Продолжительность жизни и фертильность больных не снижена.

НО-2 встречается с частотой 1:20000 – 1:60000 и является летальным в перинатальном периоде. Смерть может наступить еще во внутриутробном периоде. Дети рождаются с низким весом, имеют короткий, вздернутый нос, уменьшенную в размере грудную клетку, мягкие ключичные кости. В большинстве случаев этот вариант наследуется аутосомно-доминантно, однако, описан и аутосомно-рецессивный тип наследования при наличии кровного родства родителей больного.

НО-3 также выявляется при рождении по малому росту и деформации длинных трубчатых костей (из-за внутриутробных переломов) у ребенка. Эти признаки сохраняются на протяжении всей жизни. рост взрослых больных не превышает 92—108 см. Переломы костей приводят к их грубым деформациям. Больные этим типом НО также имеют дисморфические черты строения: треугольное лицо, микрогнатию, увеличение размеров фронтального родничка. Для больных характерно нарушение дентиногенеза, как в молочных, так и постоянных зубах, а также голубые склеры, снижение слуха, сколиоз, кифоз, легочная гипертензия.

НО-4 имеет сходные с первым типом клинические проявления, однако для больных не характерно появления голубой окраски склер и наблюдаются выраженные нарушения дентиногенеза.

Существование четырех вариантов НО обусловлено реализацией различных патологических мутаций при формировании структуры коллагена 1-го типа. К настоящему времени описано более 200 таких мутаций. К возникновению НО первого типа приводят те из них, которые затрагивают *COL1A*, причем наиболее часто у больных обнаруживается так называемая «null mutation» в гетерозиготном состоянии. В этом случае имеет место половинная по отношению к норме экспрессия проколлагена α1.

21.5.2. АУТОСОМНО-РЕЦЕССИВНЫЕ МОНОГЕННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

21.5.2.1. ХАРАКТЕРИСТИКА АУТОСОМНО-РЕЦЕССИВНОГО ТИПА НАСЛЕДОВАНИЯ

Аутосомно-рецессивный тип наследования характеризуется: 1) проявлением заболевания у гомозигот по патологической мутации; 2) передачей заболевания от здоровых родителей детям с вероятностью 25%. При этом родители больных являются здоровыми гетерозиготными носителями мутаций в гене, и сегрегация их потомства в соответствии с менделевскими закономерностями составляет 1:2:1. В этом случае 25%-ый риск возникновения заболевания отражает вероятность для потомков унаследовать мутантный ген от обоих родителей (рис. 21.9, *а*). Необходимо отметить, что к развитию заболевания приводит наличие как одинаковых, так и различных патологических мутаций, в результате которых нарушается или прекращается функционирование, экспрессируемого геном белкового продукта. Существование серии мутантных аллелей может привести к возникновению их различных комбинаций у больного. Про такого больного обычно говорят, что он является компаундом по мутантным аллелям, а существующие генетические варианты заболеваний называют *аллельными*.

Необходимо упомянуть еще один возможный механизм заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования – гетерозиготное носительство патологиче-

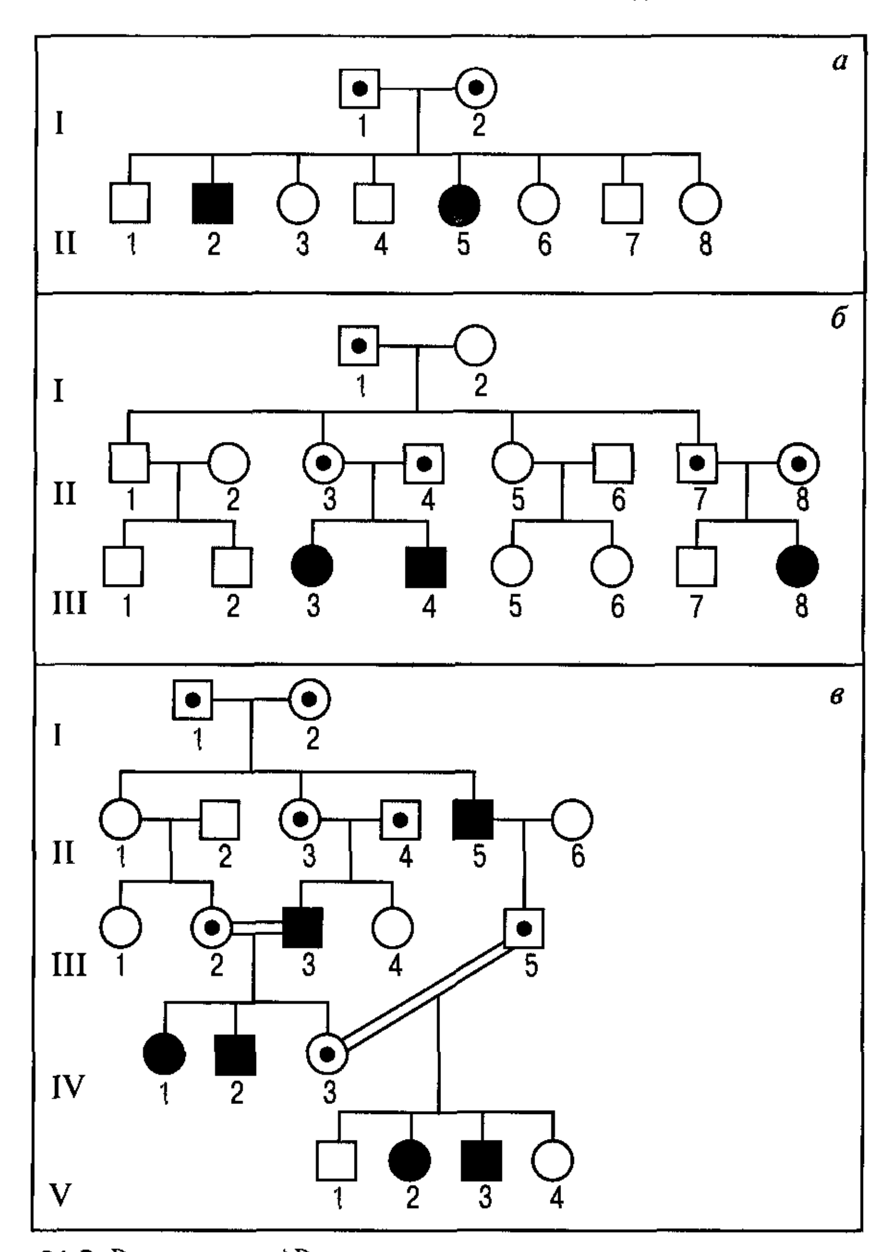


Рис. 21.9. Родословные с АР-типом наследования

а – классический вариант, б – в популяциях с высоким уровнем инбридинга; в – псевдодоминирование при кровном родстве супругов

ской мутации одним из супругов и возникновение такой же мутации в том же гене в половой клетке другого супруга. Этот механизм хотя и является теоретически возможным, но на практике регистрируется крайне редко. В случае установления тако-

го механизма возникновения заболевания (например, на основании молекулярно-генетического анализа), риск рождения больного ребенка при следующей беременности значительно уменьшается и не превышает показателя частоты возникновения мутаций в гене на гамету на поколение (μ).

В большинстве случаев, риск аутосомно-рецессивного заболевания в потомстве больного низкий, что связано с редкостью этих заболеваний и относительно невысокой частотой носительства соответствующих мутаций в популяции. Ситуация меняется, если больной вступает в брак с гетерозиготным носителем мутации. Риск заболевания у потомства в этом случае составляет 50% и не отличается от такового при аутосомно-доминантном наследовании, в связи с чем такое наследование иногда называют *псевдодоминантным*. Вероятность такого события значительно увеличивается при кровнородственном браке, когда оба супруга имеют определенную долю общих генов, полученных ими от общего предка. Пример родословной с псевдодоминантным типом наследовании, возникшем при наличии кровного родства супругов, представлен на рис. 21.9, *в*.

Совершенно очевидно, что в браках двух гомозигот по мутациям в одном и том же гене все дети будут больны. Однако, хорошо известны семьи (например, с наличием нейросенсорной тугоухости или альбинизма), в которых оба родителя были больны, однако, все их дети были здоровы. Такая ситуация возможна вследствие существования генетической гетерогенности заболевания, обусловленной полилокусностью. В этом случае родители являются гомозиготами по мутациям в различных генах, приводящими к возникновению сходных по клиническим проявлениям заболеваний.

В данной главе приводим клинико-генетические особенности наиболее распространенных аутосомно-рецессивных заболеваний — муковисцидоза, спинальной мышечной атрофии, а также некоторых заболеваний из группы нарушения половой дифференцировки. По аутосомно-рецессивному типу наследуются также большинство наследственных болезней обмена и гемоглобинопатий, характеристики которых будут изложены в гл. 23.

21.5.2.2. МУКОВИСЦИДОЗ (КИСТОЗНЫЙ ФИБРОЗ) (OMIM: 219700)

Заболевание впервые описано в 1938 г. американским патологоанатомом Д. Андерсон как «кистозный фиброз поджелудочной железы». Термин кистозный фиброз до настоящего времени широко используется в англоязычной литературе. В нашей стране принято называть это заболевание «муковисцидозом» (МВ). Муковисцидоз занимает первое место по распространенности в группе аутосомно-рецессивных наследственных болезней и встречается в среднем с частотой 1: 6000 новорожденных.

Ген МВ картирован в длинном плече 7 хромосомы (7q31.2) и содержит 24 экзона. Основной тип мутаций — короткие делеции и однонуклеотидные замены. От 50 до 70% всех мутаций приходится на долю делеции трех нуклеотидов в 10-ом экзоне гена (delF508), приводящей к отсутствию аминокислоты фенилаланина в 508 положении полипептидной цепи. К настоящему времени идентифицировано более 800 патологических мутаций, обусловливающих МВ, причем существенный процент больных являются компаундами по двум различным мутациям. Белковый продукт гена,

обозначаемый как «муковисцидозный трансмембранный регулятор проводимости» (МТРП), содержит 1480 аминокислот, экспрессируется на апикальной части экзокринных желез и обеспечивает нормальное функционирование хлорного канала, через который осуществляется транспорт ионов хлора и натрия через клеточную мембрану. Механизм действия хлорного канала представляется следующим образом. Для активации канала необходимо осуществить гидролиз АТР в структуре определенных доменов белка с помощью сАТР-зависимой протеинкиназы. Освобождающаяся при этом энергия идет на конформационные изменения белка, в результате которых активируется центральный R-белковый домен, который и выполняет роль шунта, регулирующего процесс открытия или закрытия канала. Необходимо отметить, что только 50% всего экспрессируемого белка находится на апикальной части мембраны эпителиальных клеток, тогда как остальной белок локализован в цитоплазме или в мембране эндоплазматического ретикулума.

Основной патогенетический механизм болезни – увеличение вязкости секрета, выделяемого слизеобразующими железами бронхов, кишечника, поджелудочной железы, семенников и придаточных пазух носа, что приводит к их закупорке. В результате нарушается процесс естественного очищения бронхов, в них активно размножается патогенная флора, т.е. развивается воспаление. Воспаление в свою очередь приводит к отеку слизистой бронхов и увеличению продукции вязкого секрета. Таким образом, запускается порочный круг патогенеза. В патогенетическом механизме расстройства желудочно-кишечного тракта важную роль играют изменение водно-электролитного компонента панкреатического сока, его сгущение и затруднение выделения в просвет кишечника. Это, с одной стороны, приводит к нарушению формирования каловых масс и кишечной непроходимости, а с другой – к фиброзно-кистозному изменению ткани поджелудочной железы. В ряде случаев возникновение кишечной непроходимости наблюдается в первые дни жизни ребенка, когда в результате панкреатической ахилии и дисфункции желез тонкого кишечника прекращается отхождение газов и мекония. В зависимости от типа мутаций и их локализации функции белкового продукта гена могут быть нарушены полностью или частично. Это приводит к различиям в характере клинических проявлений и течении заболевания.

Выделяют три основных клинических формы МВ: 1) *легочную* (15–20% случаев); 2) *кишечную форму* (10%); 3) *смешанную*, протекающую с сочетанным поражением легких и кишечника (75%–80%). Наряду с этим, в 1–4% случаях наблюдаются абортивные и стертые формы заболевания. Одной из таких форм может быть азооспермия и врожденный дефект семявыносящих протоков, который наблюдается при наличии ряда точковых мутаций в гене МВ в гомозиготном состоянии. У таких больных патологические симптомы поражения бронхо-легочной системы и кишечного тракта могут быть выражены минимально.

В большинстве случаев первые клинические симптомы появляются на первом году жизни, а у ряда больных – в первые месяцы жизни. Чаще всего самым ранним клиническим признаком МВ является кашель. Он носит приступообразный характер и не приводит к отделению мокроты. По мере течения болезни и присоединения воспалительного процесса, при кашле больной отхаркивает слизисто-гнойную, зловонную мокроту. У больного появляется одышка и сердечно-легочная недостаточность. В боль-

шинстве случаев поражение бронхов сопровождается нарушением функции кишечника (синдромом мальабсорбции, запорами, атрезией тонкого кишечника, выпадением прямой кишки) и поджелудочной железы (сахарный диабет, трудно поддающийся лечению). Часто у больных МВ наблюдается задержка физического развития, снижение роста и уменьшение мышечной массы.

Диагностика МВ осуществляется на основании: 1) наличия клинических симптомов поражения бронхо-легочной системы, кишечных расстройств, дисфункции поджелудочной железы; 2) увеличения концентрации хлоридов в поте больного выше 60 ммоль/л; 3) обнаружения мутаций в гене МТРП.

Безусловно, обилие патологических аллелей гена делает экономически нецелесообразным исследование всего спектра мутаций у больных МВ. С другой стороны, при муковисцидозе показана некоторая зависимость тяжести заболевания от типа мутации. Обнаружены мутации, приводящие к тяжелой форме муковисцидоза, и му-

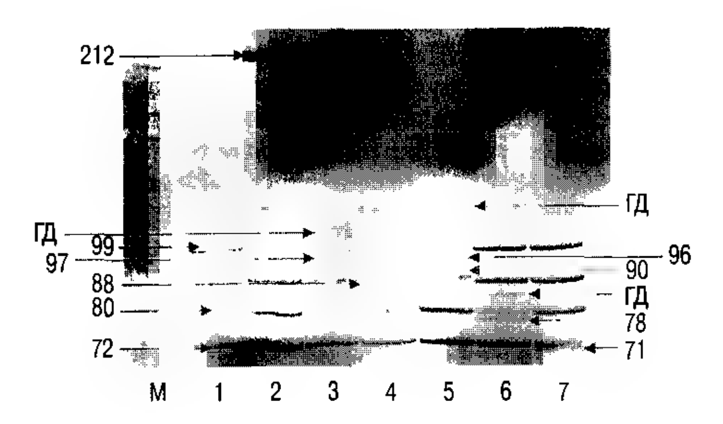


Рис. 21.10. Прямая ДНК-диагностика делеции ΔF508 при муковисцидозе. (Из: ООО «Центр Молекулярной генетики»/ Лаборатория ДНК-диагностики МГНЦ РАМН, 2001)

На рисунке представлен фрагмент электрофореграммы различных образцов ДНК больных муковисцидозом. М – дорожка с нанесенным маркером молекулярной массы (ДНК фага λ, рестрицированная PstI). Дорожка 1 ДНК здорового человека (фрагменты нормальной длины). Дорожка 2 – наличие двух мутаций –ΔF508 в гетерозиготном состоянии (обнаружен фрагмент 96 п.н. наряду с фрагментом 99 п.н., соответствующим норме; присутствуют гетеродуплексы [ГД]) и Del 21 т.п.н. в гетерозиготном состоянии (обнаружен фрагмент 212 п н., отсутствующий в норме). Дорожка 3 – мутация 1677delTA в гетерозиготном состоянии (обнаружен фрагмент длиной 97 п.н. наряду с фрагментом 99 п.н., соответствующим норме; присутствуют гетеродуплексы). Дорожка 4 две мутации – ΔF508 в гетерозиготном состоянии (обнаружен фрагмент 96 п н. наряду с фрагментом 99 п.н , соответствующим норме) и 2143delT в гетерозиготном состоянии (обнаружен фрагмент 88 п.н. наряду с фрагментом 89 п н., соответствующим норме). Дорожка 5 – наличие двух мутаций ΔF508 в гетерозиготном состоянии (обнаружен фрагмент 96 п н наряду с фрагментом 99 п н., соответствующим норме) и 2184insA в гетерозиготном состоянии (обнаружен фрагмент 90 п.н. наряду с фрагментом 89 п.н., соответствующим норме). Дорожка 6 – наличие мутации 394 delTT в гетерозиготном состоянии (обнаружен фрагмент длиной 78 п н. наряду с фрагментом 80 п н , соответствующим норме). Дорожка 7 – наличие мутации 3821delT в гетерозиготном состоянии (обнаружен фрагмент длиной 71 п.н. наряду с фрагментом 72 п н., соответствующим норме)

тации, обусловливающие более мягкое течение заболевания и мало влияющие на секреторную активность поджелудочной железы. Поэтому, в какой-то мере, детекция мутаций дает возможность прогнозирования течения болезни и помогает правильно выбрать тактику лечения. В большинстве лабораторий при ДНК-диагностике проводится исследование шести основных мутаций, которые позволяют диагностировать около 80% всех случаев заболевания.

При муковисцидозе возможна как прямая, так и косвенная ДНК-диагностика. Делеции и инсерции выявляют методом ПЦР с последующим анализом длины полученных фрагментов в полиакриламидном геле или анализом гетеродуплексов. Все мутации, создающие сайт рестрикции или приводящие к его исчезновению, выявляют с помощью амплификации области мутации, рестрикции продукта ПЦР соответствующей эндонуклеазой и последующим анализом электрофоретически разделенных фрагментов. Результаты прямой ДНК-диагностики мутаций в гене МТРП представлены на рис. 21.10.

Косвенная диагностика проводится с использованием девяти полиморфных локусов, сцепленных с геном МТРП. Существенным недостатком метода является необходимость обследования больного ребенка, поскольку только таким способом можно определить, с каким маркерным аллелем каждого из родителей сцеплен мутантный ген.

21.5.2.3. ПРОКСИМАЛЬНАЯ СПИНАЛЬНАЯ АМИОТРОФИЯ (OMIM: 253300, 253550,253400)

Это второе по частоте заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования после муковисцидоза.

Проксимальная спинальная амиотрофия (САМ) встречается в трех аллельных вариантах, различающихся возрастом начала и тяжестью клинического течения. Первый вариант описал Г. Вердниг в 1891 г., третий вариант — Е. Кугельберг и Л. Веландер в 1956 г., второй промежуточный вариант предложил выделять Дубовиц.

САМ-1 — *болезнь Вердниг-Гофмана* развивается в первые шесть месяцев жизни и характеризуется тяжелым злокачественным течением. Признаком заболевания, заметным еще во внутриутробном периоде, можно считать слабое шевеление плода. В неонатальном периоде отмечается выраженная мышечная гипотония, гипотрофия с преимущественным поражением проксимальных мышц, угасание сухожильных рефлексов, фибриллярные подергивания мышц языка и пальцев кистей. Дети никогда не держат голову и не переворачиваются. Отмечается своеобразная поза ребенка («поза лягушки»): отведение конечностей в плечевых и тазобедренных суставах и сгибание в локтевых и коленных суставах. Первыми поражаются мышцы проксимальных отделов нижних конечностей, и процесс имеет восходящее распространение. Вовлечение дыхательной мускулатуры (межреберных мышц и диафрагмы) приводит к возникновению деформации грудной клетки по типу седловидной, воронкообразной или килевидной, а также сколиоза и кифоза в грудо-поясничном отделе позвоночника. По мере прогрессирования заболевания поражение распространяет-

ся на мышцы гортани и глотки вследствие вовлечения в процесс ядер каудальной группы черепно-мозговых нервов. В ряде случаев при этом варианте САМ первые признаки болезни могут появиться в более старшем возрасте. В этих случаях дети могут держать голову и даже переворачиваются, однако, никогда самостоятельно не садятся. Отмечена корреляция между временем появления первых признаков заболевания и продолжительностью жизни. Большинство больных с врожденным вариантом болезни погибают при явлениях сердечной или дыхательной недостаточности, а также от присоединившихся инфекций до годовалого возраста. В целом при этой форме проксимальных САМ продолжительность жизни ограничена двумя годами. Считается, что только 10–12% больных переживают пятилетний возраст.

САМ-2 характеризуется более поздним началом (от 6 до 18 месяцев) и менее злокачественным течением. Для больных характерен период нормального раннего развития: ребенок способен держать голову, садиться, однако, самостоятельно не ходит. Для этой формы заболевания характерны фасцикулярные подергивания мышц кистей, языка, плечевого и тазового пояса, тремор кончиков пальцев вытянутых рук, контрактуры в суставах и деформации позвоночника. Продолжительность жизни больных с этим вариантом заболевания в среднем составляет 10–12 лет.

САМ-3 — *болезнь Кугельберга–Веландер* — возникает в широком возрастном диапазоне от 18 месяцев до 20 лет. Наиболее часто первыми поражаются проксимальные группы мышц тазового пояса. Как правило, в возрасте 2–7 лет дети начинают испытывать трудности при ходьбе, беге, подъеме по лестнице и из положения на корточках. В этот период клинические проявления заболевания имеют значительное сходство с таковыми при прогрессирующей мышечной дистрофии Бекера. Сходство дополняется возникновением у 18-25% больных этим вариантом САМ псевдогипертрофий икроножных мышц, а также выраженного лордоза в поясничном отделе позвоночника. Поражение проксимальных отделов рук и плечевого пояса возникают спустя несколько лет после начала заболевания. Также как и при втором варианте спинальной амиотрофии у больных развивается тремор пальцев рук, фасцикуляции различных мышечных групп и деформация грудной клетки.

При морфологическом исследовании биоптатов мышечных волокон выявляются атрофированные и гипертрофированные волокна, а также скопления мелких круглых волокон («пучковая» атрофия).

При патоморфологическом изучении выявляется набухание, сморщивание или атрофия мотонейронов передних рогов спинного мозга, а в ряде случаев ядер черепно-мозговых нервов.

На электронейромиограмме обнаруживаются специфические признаки поражения передних рогов спинного мозга — «ритм частокола» (спонтанная ритмическая активность).

Гены, ответственные за возникновение всех трех вариантов заболевания картированы на хромосоме 5q12.2-13. Особенности наследования заболевания связаны с характером структуры этого хромосомного региона (рис. 21.11.), который представлен инвертированным повтором и включает, по крайней мере, четыре гена, мутации в которых могут вносить определенный вклад в этиологию заболевания или модифицировать тяжесть его течения. Более 95% больных с 1–3 вариантами САМ имеют делецию 7-го и / или 8-го экзона теломерной копии *SMN*-гена (гена выживаемости мо-

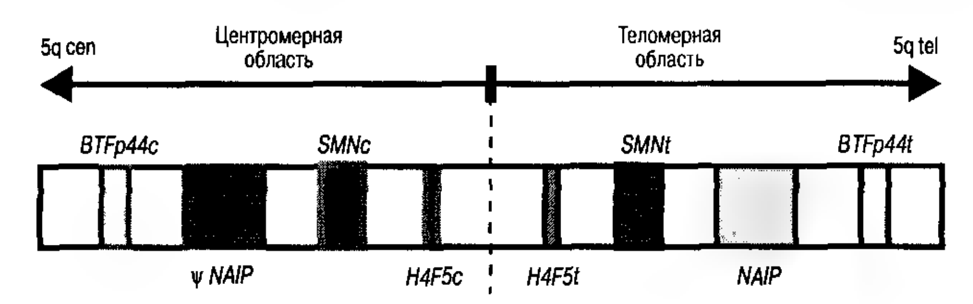


Рис. 21.11. Структура хромосомного региона 5q12.2-13

тонейронов) в гомозиготном состоянии. Остальные пациенты являются компаунд-гетерозиготами и имеют делецию в одном из этих генов, в то время как в другом, расположенном на гомологичной хромосоме, обнаруживаются сплайсинговые или миссенс-мутации. Мутация в теломерной копии гена *SMN* может быть необходимым, но недостаточным условием развития болезни, так как описаны здоровые люди, имеющие такую мутацию в гомозиготном состоянии. Второй ген, расположенный в этой области – *NAIP* (ген ингибитора нейронального апоптоза), также имеет копии. Делеции одного или нескольких экзонов этого гена в гомозиготном состоянии встречаются у 40 -70% больных с САМ первого типа и у 14—22% больных с САМ второго и третьего типа. У подавляющего числа больных, имеющих делецию 7-го и 8-го экзонов *SMN*-гена в гомозиготном состоянии, обнаруживается также делеция и в гене *NAIP*. Еще один ген, обозначаемый как *H4F5*, расположен в непосредственной близости от гена *SMN*. Этот ген оказывается делетированным у больных со спинальной амиотрофией первого типа. Предполагается, что ген *H4F5* также участвует в модификации тяжести клинического течения различных вариантов проксимальных САМ. Четвертый ген, вовлеченный в механизм возникновения заболевания – *BTF44* также представлен несколькими копиями. Показано, что 15% больных с различными типами САМ имеют делецию этого гена в гетерозиготном состоянии. Связи наличия мутаций в этом гене с тяжестью течения заболевания не выявлено.

Таким образом, ведущим этиологическим фактором проксимальных САМ следует считать наличие делеции в гомозиготном состоянии в теломерной копии *SMN*-гена. Факторами, модифицирующими тяжесть течения заболевания и приводящими к возникновению аллельных вариантов проксимальных САМ, являются: 1) количество центромерных копий *SMN*-гена (две при первом типе САМ и от трех до пяти при втором и третьем); 2) наличие делеций в генах *NAIP* и *H4F5*. Не исключено существование других модифицирующих механизмов, в частности возникновение, так называемого, химерного гена, образующегося в результате генной конверсии между теломерной и центромерной копиями *SMN*-гена.

Кодируемый геном *SMN* белок содержит 294 аминокислоты и экспрессируется во всех тканях организма. Наибольшее количество белка обнаружено в мотонейронах спинного мозга. В цитоплазме и ядре соматических клеток SMN ассоциирован с другим белком - SIP1. В ядре эти белки концентрируются в специальных тельцах, названных *гемами*. Считается, что в цитоплазме SMN- и SIP1-белки взаимодейству-

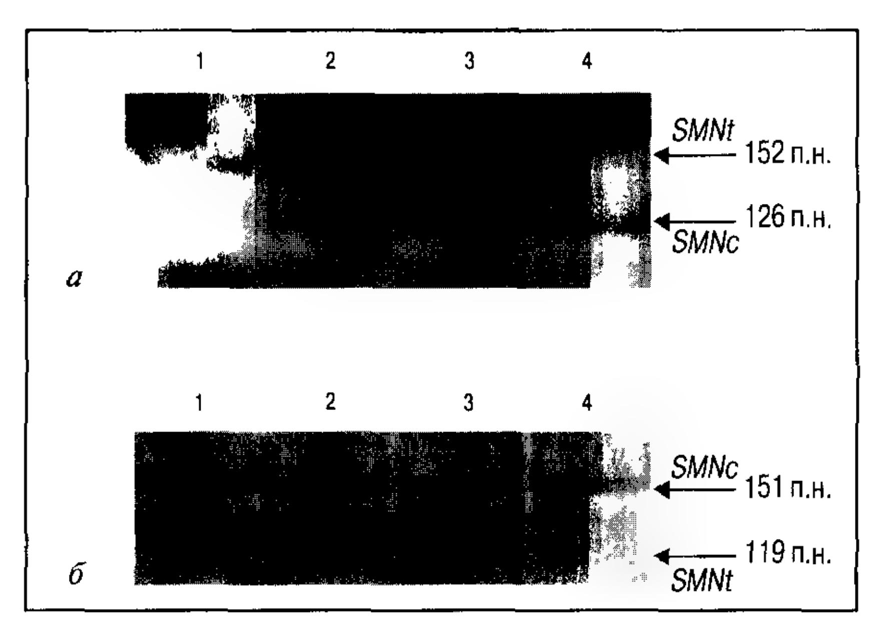


Рис. 21.12. Молекулярно-генетическая диагностика спинальной амиотрофии. (Из: ООО «Центр Молекулярной генетики»/Лаборатория ДНК-диагностики МГНЦ РАМН, 2001)

На рисунке представлены электрофореграммы образцов ДНК больного спинальной амиотрофией (дорожка 4), его родителей (дорожки 2,3) и здорового контроля (дорожка 1): а анализ делеции 7-го экзона гена SMNt; б – анализ делеции 8 экзона гена SMNt

Делеция регистрируется при отсутствии полосы соответствующей длины (дорожка 4). При соотношении интенсивности полос генов SMNt и SMNc 1:2 регистрируется гетерозиготное носительство делеции (дорожки 2, 3). В случае нормы регистрируется соотношении интенсивности полос генов SMNt и SMNc 1:1 (дорожка 1) При анализе соотношения интенсивности полос фрагментов 7-го экзона исследуемых генов следует учитывать, что в норме фрагмент гена SMNt выглядит ярче, чем при гетерозиготном носительстве делеции

ют с *Sm*-коровыми белками малых ядерных рибонуклеопротеинов (мяРНК). Предполагается, что в ядрах SMN-белок необходим для сплайсинга пре-мРНК. Вполне вероятно, что он участвует в процессах регенерации и повторных циклов образования мяРНК, поскольку при наличии мутации в *SMN*-гене этот процесс у больных нарушается.

Диагностика заболевания осуществляется на основании типичных клинических признаков поражения мотонейронов передних рогов спинного мозга, электронейромиографического обследования и ДНК-анализа, направленного на идентификацию делеции 7-го и/или 8-го экзона гена *SMN*.

Основу прямой ДНК-диагностики САМ составляют различия в нуклеотидных последовательностях 7-го и 8-го экзонов *SMNt*- и *SMNc*-генов. Поиск делеций в указанных экзонах теломерной копии *SMN*-гена осуществляется с использованием рестрикционных эндонуклеаз, сайты узнавания которых лежат в районах нуклеотидных замен исследуемых экзонов: *DraI* или *HinfI* для 7-го экзона и DdeI для 8-го экзона. Делеция 7-го и/или 8-го экзона теломерной копии гена *SMN* представляет собой

мажорную мутацию, которая наблюдается у 95–98% больных. У остальных больных подобные делеции регистрируются в гетерозиготном состоянии, при этом в гомологичной хромосоме обнаруживаются другие мутации. Методика выявления делеций основана на ПЦР-анализе с последующей рестрикцией ПЦР-продуктов экзонов 7 и 8. Пример обнаружения делеции в гене *SMNt* представлен на рис. 21.12.

При отсутствии этой мутации у больных с типичными клиническими проявлениями САМ ДНК-анализ может быть продолжен. На следующем этапе диагностики заболевания могут быть использованы методы количественной оценки копий генов *SMNt* и *SMNc*. В основе этих методов лежит описанный выше способ регистрации делеций 7-го экзона гена *SMNt* с помощью рестрикции с дополнительным введением в амплификацию синтезированных in vitro внутренних стандартов (участок гена *CFTR*, гена ретинобластомы *RB1*, модифицированная последовательность 7-го экзона гена *SMN*) с последующим денситометрическим анализом. Обнаружение у пациентов, не имеющих делеции в гене *SMNt*, единственной копии гена косвенным образом подтверждает диагноз САМ и дает толчок к поиску точковых мутаций в оставшейся копии, которые иногда могут служить этиологическим фактором заболевания. В очень редких случаях, главным образом у пациентов с тяжелой формой САМ, проводится поиск делеции 5–6-го экзонов гена *NAIP*. Однако это исследование уступает по своей эффективности и информативности поиску делеций в гене *SMNt*, поскольку при анализе делеций в этих генах в различных популяциях, не было обнаружено ни одного пациента с САМ, у которого в гене *NAIP* имелись повреждения, а в *SMNt*-гене они отсутствовали.

В настоящее время косвенная ДНК-диагностика САМ несколько утратила свою актуальность в связи с возможностью напрямую регистрировать повреждения, приводящие к заболеванию. Тем не менее, большое количество полиморфных ДНК-маркеров, тесно сцепленных с локусом САМ, могут быть использованы при проведении пренатальной ДНК-диагностики в сочетании с прямыми методами исследования.

С помощью ДНК-анализа при этом заболевании удается успешно проводить дородовую диагностику и идентификацию гетерозиготного носительства мутации в *SMNt*-гене.

21.5.2.4. МОНОГЕННЫЕ СИНДРОМЫ НАРУШЕНИЯ ПОЛОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПО ЖЕНСКОМУ ТИПУ

Аутосомно-рецессивный тип наследования характерен для ряда основных моногенных синдромов нарушения половой дифференцировки, приводящих к возникновению различных вариантов ложного женского и мужского гермафродитизма. Молекулярно-генетические характеристики этих синдромов представлены в табл. 21.4.

Адреногенитальный синдром (АГС) (OMIM: 201910, 202010; 202110; 201710). Наиболее многочисленной и хорошо изученной является группа заболеваний, объединяемая общим названием – адреногенитальный синдром. Общая распространенность всех форм АГС составляет 1:12 000 новорожденных. В основе патогенеза этой груп-

Таблица 21.4. **Характеристика основных моногенных форм, сопровождающихся ложным гермафродитизмом (с учетом классификации аномалий полового развития по Grumbach M.M., Conte F.A., «Disorders of sex differentiation»)**

Моногенная форма	OMIM	Локализация гена	Кодируемый продукт
Женский ложный гермафродитизм (андрогениндуцированный)			
1. *Варианты врожденной гиперплазии надпочечников*			
АГС I	118485	15q23-24	CYP 11A
АГС II	201810	1p13.1	3bHSD
АГС III	201910	6p21.3	CYP 21
АГС IV	202010	8q21	CYP 11B1
2. Недостаточность ароматазы	107910	15q21.1	CYP 19
Мужской ложный гермафродитизм			
1. *Наследственные дефекты биосинтеза тестостерона*			
а) Дефекты ферментов, влияющих на биосинтез кортикостероидов и тестостерона			
АГС II	201810	1p13.1	3bHSD
АГС V	202110	10q24.3	CYP 17
б) Дефекты ферментов, первично нарушающих биосинтез тестостерона в яичках			
недостаточность 17bHSD	601860	5q2	17βHSD
2. *Дефекты чувствительности тканей-мишеней к андрогенам*			
а) Нечувствительность (резистентность) к андрогенам			
синдром персистенции	600957	19p13.3-13.2	АМГ
мюллеровых протоков	600956	12q13	рецептор к АМГ
б) Дефекты метаболизма тестостерона в периферических тканях			
синдром Шапеля	264600	2p23	SRD5A

пы заболеваний – нарушение активности одного из ферментов каскада синтеза половых гормонов и стероидных гормонов надпочечников. В том случае, если этиологическим фактором наследственного заболевания служит мутация в генах ферментов начальных этапов биосинтеза гормонов, клинические проявления могут наблюдаться у лиц мужского и женского пола и характеризоваться сочетанием симптомов надпочечниковой недостаточности и нарушениями половой дифференцировки. К настоящему времени хорошо описано пять основных вариантов АГС, обусловленных снижением активности основных ферментов стероидного биогенеза (рис. 21.13.), четыре из которых контролируются микросомальными цитохромами (CYP).

АГС-1 встречается крайне редко и обусловлен мутациями в гене *CYP 11A*, приводящими к дефициту холестерол-десмолазы. Этот фермент обеспечивает начальный этап биосинтеза гормонов, в результате которого из холестерола образуется прегненолон – предшественник всех трех групп стероидных гормонов. Дефицит прегненолона приводит к тяжелой дисфункции коры надпочечников, сопровождающейся накоплением в них холестерола, выраженными нарушениями водно-электролитного баланса в организме (кахексией, обезвоживанием), гиперпигментацией кожных покровов, артериальной гипотензией. У больных мужского пола, наряду с этим отмечается нарушение строения половых органов – гипоплазия или агенезия гонад.

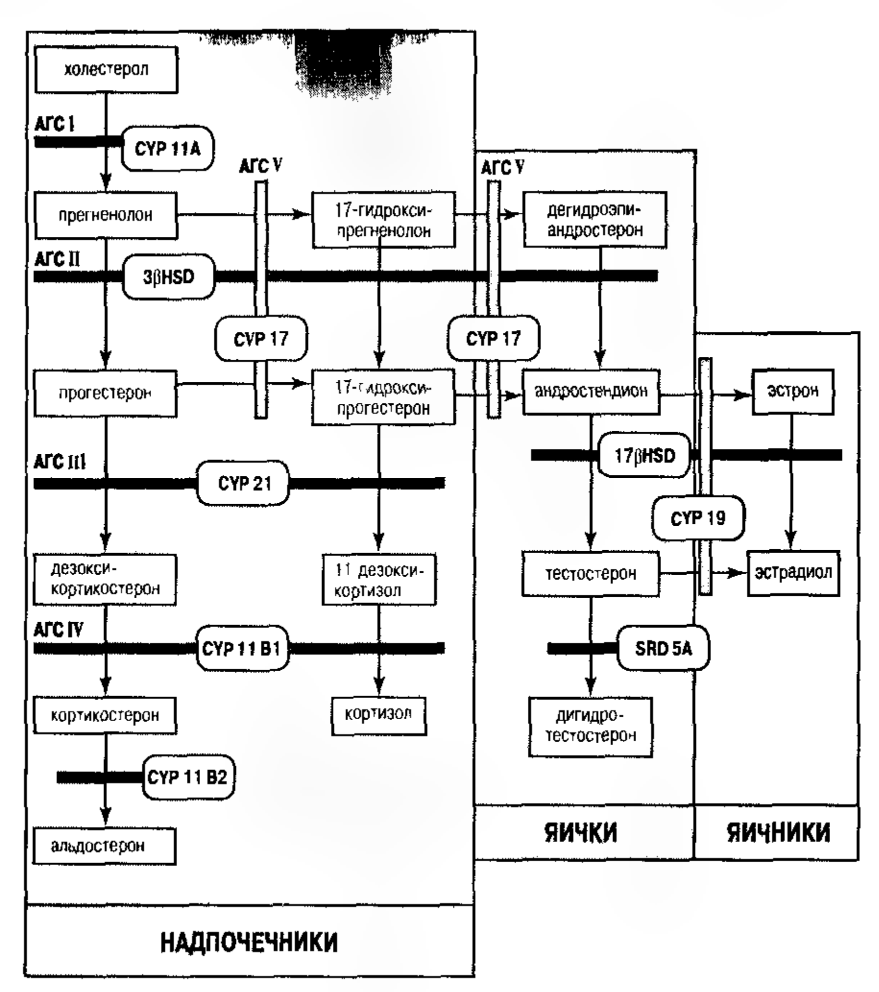


Рис. 21.13. Метаболические блоки синтеза стероидных гормонов, приводящие к развитию синдромов нарушения половой дифференцировки. (АГС и др.)

CYP 11A – холестерол-десмолаза; CYP 11B1 – 11β_1-гидроксилаза; CYP 11β_2 – 11β_2-гидроксилаза, CYP 17 – 17β-гидроксилаза; CYP 19 - ароматаза; CYP 21 – 21-гидроксилаза; 3βHSD – 3β-гидроксистероид-дегидрогеназа; 17βHSD - 17β-гидроксистероид-дегидрогеназа; SRD5A – 5-α-редуктаза

У больных девочек часто отмечаются признаки вирилизации. При биохимическом анализе в крови больных выявляется увеличение концентрации АКТГ, а в моче – избыточное выделение хлора. Все больные погибают в первый год жизни от интеркуррентных инфекций.

АГС-2 обусловлен дефицитом фермента 3-β-гидроксистероидной дегидрогеназы, катализирующей превращение прегненолона в прогестерон. Клинически заболевание проявляется признаками ложного гермафродитизма у мальчиков и гипертрофи-

ей клитора у девочек. Наряду с этим отмечается различная степень выраженности надпочечниковой недостаточности.

АГС-3 – наиболее распространен и составляет 95% всех случаев врожденной гиперплазии коры надпочечников. Этиологическим фактором заболевания является мутация в гене *CYP21* для микросомального цитохрома *P-450c21*, контролирующего синтез фермента 21-гидроксилазы, катализирующего превращение 17-α-гидроксипрогестерона в 11-дезоксикортизол. Ген локализован на хромосоме 6p21.3 внутри мультигенного комплекса *HLA*, включающего гены, продукты которых обеспечивают иммунные реакции организма (подробнее о генах этого комплекса см. в гл. 24). Помимо функционально активного гена – *CYP21* в этом регионе находится неактивный псевдоген *CYP21P*). Ген и псевдоген содержат по 10 экзонов и отличаются по 87 нуклеотидам. Ген и псеадоген находятся в тандемной дупликации с генами, кодирующими С4А- и С4В-компоненты комплемента. Высокая степень гомологии гена и псеадогена, находящихся в непосредственной близости, способствует возникновению нереципрокного спаривания и неравного кроссинговера между сестринскими хроматидами в мейозе, что приводит к перемещению участка активного гена на псевдоген (генной конверсии) или делеции активного гена.

Наиболее частый тип мутаций в гене *CYP21* (около 40%) – делеции, в 20% случаев выявляется генная конверсия и в 25% – точковые мутации.

Различают четыре клинических формы АГС 3: 1) сольтеряющая форма, составляющая не менее 2/3 всех случаев; 2) вирильная форма; 3) поздний (неклассический) вариант и 4) латентная (бессимптомная) форма. Подавляющее число больных с АГС-3 страдают сольтеряющей и вирильной формой. Все формы заболевания являются аллельными вариантами и связаны с различными нарушениями в одном и том же гене.

Сольтеряющая форма АГС-3 характеризуется сочетанием симптомов вирилизации у девочек и преждевременного полового созревания у мальчиков с выраженной патологией солевого обмена, которая возникает вследствие нарушения функционирования ренин-альдостероновой системы и потери способности почек удерживать ионы натрия. Клинически эти нарушения проявляются повторными рвотами, пилороспазмом, резкой потерей веса, симптомами недостаточности периферического кровообращения, коллаптоидными состояниями. В крови обнаруживается ацидоз и соответствующие метаболическому блоку гормональные сдвиги.

Диагностика заболевания осуществляется на основании характерных клинических проявлений (особенно выраженных при сольтеряющей форме заболевания), а также на основании биохимического обследования (обнаружение снижения активности 21-гидроксилазы) и молекулярно-генетического анализа. Прямая ДНК-диагностика направлена на поиск наиболее частых мутаций в гене *CYP21* – делеции 8 нуклеотидов в 3-ем экзоне и мутации сайта сплайсинга во 2-ом интроне, на долю которых прнходится 65% всех мутаций при этой форме АГС. В ряде случаев, проводится косвенная диагностика с использованием в качестве маркеров различных генов *HLA*.

Вирильная форма АГС 3 у девочек может быть диагностирована в первые дни жизни по наличню признаков маскулинизацни, степень выраженности которых значительно варьирует (от гипертрофии клитора, до выраженных нарушений дифференцировки наружных половых органов, затрудняющих определение пола ребенка). Столь раннее выявление признаков вирилизации обусловлено избыточной продук-

і андрогенов вследствие увеличения уровня адренокортикотропного гормона ги-изы еще при внутриутробном развитии. Внутренние половые органы у девочек рмированы правильно, кариотип 46,XX. Диагностика этого варианта АГС у ьчиков затруднена, так как нарушений развития гениталий у них не наблюдает-Іервые признаки заболевания появляются в возрасте 5–7 лет и характеризуются птомами преждевременного полового созревания. Избыточная стимуляция тес-ул андрогенами может привести к их выраженным морфологическим изменени-и, в конечном итоге, к бесплодию. В первом десятилетии жизни рост больных, правило, ускорен, однако в подростковом возрасте приостанавливается.

АГС-4 обусловлен дефицитом фермента 11-β_1-гидроксилазы и по клиническим явлениям в значительной степени сходен с АГС-3. Характерная особенность это-варианта заболевания – выраженная артериальная гипертензия, приводящая к ологическим изменениям глазного дна, сосудов почек и сердца. Артериальная ги-ртензия возникает в детском возрасте и имеет достаточно злокачественное тече-:.

АГС-5 встречается крайне редко и обусловлен блокированием превращения про-герона в 17-α-гидроксипрогестерон. Клинические проявления этого варианта дны с таковыми при АГС-2.

21.5.2.5. МОНОГЕННЫЕ СИНДРОМЫ НАРУШЕНИЯ ПОЛОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПО МУЖСКОМУ ТИПУ

рушение процессов формирования гонад по мужскому типу обусловлено двумя новными причинами: возникновением структурных и количественных перестроек ловых хромосом (гл. 20) и мутациями в генах, контролирующих биосинтез андро-нов (мужских половых гормонов) в надпочечниках и яичках. Клинические прояв-ния этих нарушений могут варьировать от нерезко выраженной гипоспадии до лного отсутствия вирилизации и формирования наружных половых органов по нскому типу.

В настоящее время хорошо изучены три заболевания, обусловленные нарушени-я процессов дифференцировки половых органов по мужскому типу – синдром пер-истенции мюллеровых протоков, возникающий в результате недостаточности син-:за антимюллерова гормона (АМГ), синдром недостаточности фермента – 5-α-ре-уктазы и синдром тестикулярной феминизации, связанный с нарушением функции дрогенового (дигидротестостеронового) рецептора.

В норме развитие вольфовых протоков в семенные пузырьки, выводные протоки эпидермис происходит под действием тестостерона, продуцируемого клетками Іейдига посредством его связывания с андрогеновыми рецепторами. Формирование ростаты, мошонки и полового члена происходит под действием дигидротестостеро-а, в который превращается тестостерон под действием фермента 5-α-редуктазы (гл.). АМГ, продуцируемый клетками Сертоли, вызывает регрессию мюллеровых про-оков и играет важную роль в формировании яичек и созревании половых клеток.

Характеристики первых двух синдромов, наследующихся аутосомно-рецессивно,

представлены в данной главе. Синдром тестикулярной феминизации, наследующийся X-сцепленно рецессивно, будет описан в гл. 22.

Синдром персистенции мюллеровых протоков (СПМП) (OMIM: 600956; 600957). Этот синдром представляет собой одну из форм ложного мужского гермафродитизма, наследуемую по аутосомно-рецессивному типу. Заболевание возникает в результате широкого спектра мутаций в гене АМГ, локализованном на хромосоме 19p13.3-13.2, или в гене его рецептора, расположенном в области хромосомы 12q13. Мутации в этих генах нарушают синтез, процессинг и секрецию АМГ, функционирование АМГ-рецепторного комплекса и, следовательно, передачу внутриклеточного сигнала.

В основе патогенеза заболевания лежит нарушение процесса инволюции мюллеровых протоков, приводящее к формированию матки, маточных труб и верхней части влагалища у лиц мужского пола с кариотипом 46,XY. Инволюция мюллеровых протоков осуществляется под действием антимюллерового гормона, секретируемого клетками Сертоли с 7–8-й недели эмбрионального развития, сразу после дифференцировки гонад по мужскому типу. Этот процесс длительный и продолжается в постнатальном периоде вплоть до полового созревания мужчины. Надо отметить, что низкий уровень экспрессии этого гормона сохраняется и у взрослого мужчины, вызывая дегенерацию эпителиальных клеток, локализованных в области мюллеровых протоков.

Клинические проявления СПМП разнообразны. Все больные имеют мужской фенотип. В качестве основного симптома часто выступает одно или двухсторонний крипторхизм и паховые грыжи. В грыжевом мешке часто находятся гипоплазированные матка и маточные трубы. В некоторых случаях матка может располагаться не в грыжевом мешке, а в области малого таза, при этом яички располагаются в области ее широкой связки. Дериваты мюллеровых протоков у мужчин часто не выявляются при клиническом осмотре и обнаруживаются, главным образом, при проведении хирургической операции по поводу ушивания грыжевого отверстия. Репродуктивная функция у большинства мужчин с СПМП оказывается нарушенной, несмотря на то, что дифференцировка яичек не изменена. Ведущую роль в этом процессе могут играть анатомические нарушения в связочном аппарате яичек или изменения соотношения анатомических структур придатков яичка.

Синдром недостаточности 5-α-редуктазы (OMIM:264600). Еще один вариант ложного мужского гермафродитизма наблюдается при недостаточности фермента 5-α-редуктазы. Причиной его возникновения являются мутации в гене, кодирующем этот фермент. Ген 5-α-редуктазы локализован на хромосоме 2p23.

Клинические проявления этого синдрома характеризуются различной степенью мужского ложного гермафродитизма: неполной вирилизацией наружных половых органов, гипоспадией с наличием слепо заканчивающегося влагалища, крипторхизмом и гипоплазией предстательной железы. В паховом канале таких больных располагаются яички. В большинстве случаев тип строения наружных половых органов больных больше напоминает женский. Однако, в ряде случаев, в пубертатном периоде наступает выраженная вирилизация наружных половых органов, что приводит к необходимости проведения хирургической коррекции, приводящей к смене пола с женского на мужской.

ГЛАВА 22 БОЛЕЗНИ С НЕТРАДИЦИОННЫМИ ТИПАМИ НАСЛЕДОВАНИЯ

Исследования последних лет показали, что только треть всех наследственных заболеваний имеют традиционный моногенный аутосомный тип наследования. Характер наследования остальных – не согласуется с законами Менделя, предполагающими одинаковое действие генов, полученных от обоих родителей. К настоящему времени известны четыре основные группы таких болезней:

1) заболевания, наследуемые сцепленно с полом, при которых мутантный ген находится на X- или Y-хромосомах;

2) митохондриальные заболевания, возникающие в результате мутаций митохондриальных генов;

3) болезни геномного импринтинга (БГИ);

4) болезни, обусловленные экспансией тринуклеотидных повторов (БЭТП) в регуляторных или транскрибируемых частях генов.

Изучение таких болезней имеет большое значение для медико-генетического консультирования, так как выявление основ их этиологии и патогенеза позволит более точно проводить проспективное консультирование и профилактику возникновения повторных случаев заболевания в отягощенных семьях.

В данной главе приводятся основные характеристики различных групп заболеваний с нетрадиционным типом наследования, а также клинико-генетические особенности наиболее типичных нозологических форм.

22.1. ЗАБОЛЕВАНИЯ, НАСЛЕДУЕМЫЕ СЦЕПЛЕННО С ПОЛОМ

К этой группе относятся болезни, возникновение которых обусловлено мутациями в генах половых хромосом. Для большинства рассматриваемых заболеваний характерен сцепленный с X-хромосомой тип наследования. Y-хромосома содержит небольшое число генов, мутации в которых приводят к развитию наследственных болезней, сопровождающихся нарушением функционирования мужских половых желез. Эти гены в основном расположены в псевдоаутосомных областях.

Как и для менделирующих моногенных болезней, гены которых локализованы на аутосомах, для заболеваний, сцепленных с X-хромосомой, описан рецессивный и доминатный тип наследования.

22.1.1. ХАРАКТЕРИСТИКА Х-СЦЕПЛЕННОГО РЕЦЕССИВНОГО ТИПА НАСЛЕДОВАНИЯ

Заболевания с Х-сцепленным рецессивным типом наследования возникают у лиц мужского пола при наличии мутантного гена в гемизиготном состоянии. Женщины являются, как правило, кондукторами (передатчиками) мутантного гена, который находится у них в гетерозиготном состоянии на одной из Х-хромосом. Пример родословной с Х-сцепленным рецессивным типом наследования представлен на рис. 22.1.

Можно выделить три основных механизма передачи матерью мутантного гена, локализованного в Х-хромосоме, своим сыновьям:

1) гетерозиготное носительство мутации в каждой клетке организма;

2) существование определенного клона половых клеток с наличием мутации (гонадный мозаицизм);

3) возникновение мутации de novo в единственной половой клетке.

Соотношение сегрегирующих случаев заболевания, возникших при передаче гена от гетерозиготных матерей, и обусловленных свежей мутацией варьирует при каждом Х-сцепленном рецессивном заболевании. Эти данные могут быть использованы при расчетах риска возникновения заболевания у сибсов пробандов с Х-сцепленным рецессивным заболеванием. Существует лишь несколько ситуаций, в которых можно сделать однозначное заключение о носительстве женщиной рецессивного мутантного гена на Х-хромосоме:

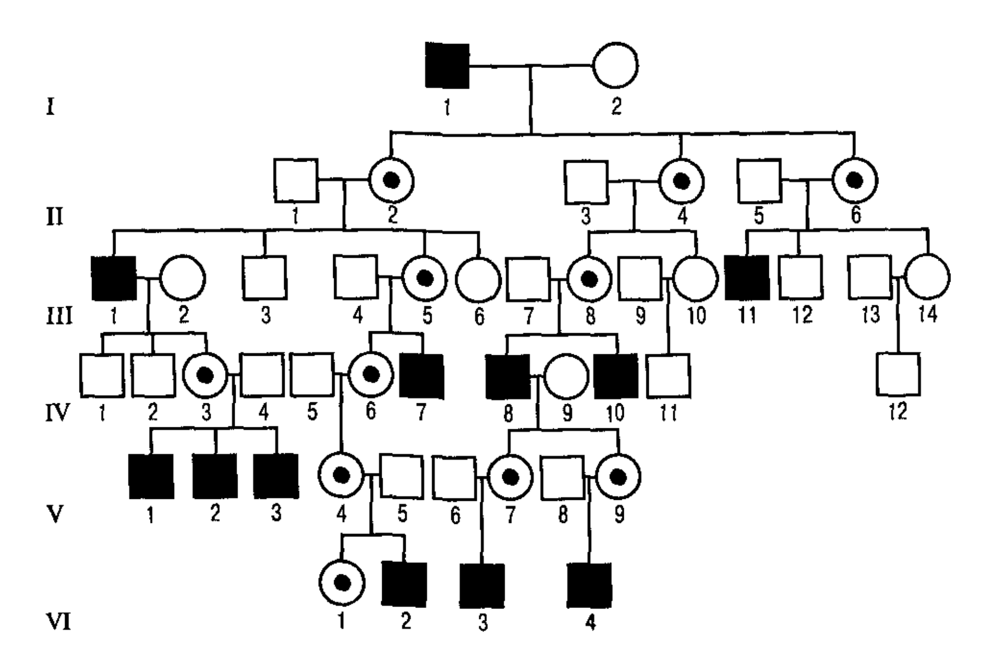


Рис. 22.1. Родословная с Х-сцепленным рецессивным типом наследования

1) женщина является дочерью больного с Х-сцепленным рецессивным заболеванием (гетерозиготными носительницами являются все дочери больного);

2) женщина имеет больного сына и больного брата;

3) у женщины родилось двое больных мальчиков. Необходимо отметить, что в последнем случае не исключено существование гонадного мозаицизма. При некоторых заболеваниях с Х-сцепленным рецессивным типом наследования у женщин носительниц можно выявить ряд биохимических, рентгенологических и других малых признаков заболевания. Например, при прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшенна у 2/3 гетерозиготных носительниц обнаруживается в крови повышение активности фермента креатинфосфокиназы выше 150 ед/л. Если устанавливается факт гетерозиготного носительства женщиной патологического гена, риск возникновения заболевания у ее сыновей составляет 50%, такая же вероятность существует для дочерей данной женщины быть здоровыми гетерозиготными носительницами.

В редких случаях отмечается появление клинических признаков Х-сцепленного рецессивного заболевания у женщин. Существует несколько механизмов их возникновения:

1) количественные или структурные перестройки Х-хромосомы в области локализации гена (полная или частичная моносомия по Х-хромосоме, делеции или транслокации);

2) гомозиготность женщины по мутации в гене, возникшая при наличии заболевания у отца и гетерозиготного носительства мутации у матери;

3) несбалансированная инактивация одной из Х-хромосом в тканях-мишенях у гетерозиготных носительниц мутации.

В главе, посвященной описанию хромосомных синдромов, мы рассматривали гипотезу, по которой одна из Х-хромосом нормальных женщин инактивируется (лайонизируется) в раннем периоде эмбрионального развития (гл. 12). В подавляющем большинстве случаев возникает, так называемая, *сбалансированная лайонизация*, предполагающая равновероятную инактивацию Х-хромосомы отцовского и материнского происхождения. Однако в ряде случаев инактивируется преимущественно Х-хромосома, полученная от одного из родителей, т.е. имеет место *несбалансированная лайонизация*. Если этот феномен возникает у женщин гетерозиготных по мутации в гене Х-сцепленного заболевания, то функционально активной у них может оказаться Х-хромосома, несущая патологическую мутацию. В качестве примера заболевания с Х-сцепленным рецессивным типом наследования рассмотрим прогрессирующую мышечную дистрофию Дюшенна – самое распространенное заболевание этой группы.

22.1.1.1. ПРОГРЕССИРУЮЩАЯ МЫШЕЧНАЯ ДИСТРОФИЯ ДЮШЕННА/БЕКЕРА (OMIM: 310200).

Заболевание встречается в двух клинических формах, являющихся аллельными генетическими вариантами: прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшенна (ПМДД) и Бекера (ПМДБ). Первый вариант был описан еще в 1868 г., его распро-

страненность составляет 1 на 3–3,5 тыс. новорожденных мальчиков. О наличии второго варианта П. Бекер сообщил в 1955 г. Он встречается с частотой 1 на 20–25 тыс. лиц мужского пола.

Заболевание возникает в результате мутаций в гене дистрофина, локализованном в области Xp21. Приблизительно 30% всех случаев связаны с мутациями de novo в яйцеклетке матери больного, а остальные 70% — обусловлены гетерозиготностью матери по патологической мутации в гене дистрофина. Считается, что 6–7% всех спорадических случаев – результат гонадного мозаицизма (наличия в яичниках женщины нескольких генераций ооцитов с нормальными и мутантными аллелями гена дистрофина). Основной тип мутации, обнаруженный у 60%–70% больных, — это крупные делеции, захватывающие один или несколько экзонов гена и локализующиеся в двух «горячих» регионах в области 5′-конца (экзоны 6–19) и 3′-конца (экзоны 40–43). У 5% больных выявлены дупликации, в остальных случаях — точковые мутации в различных участках гена.

Особенности клинических проявлений при двух аллельных вариантах заболевания связывают с различиями в типах мутаций в гене дистрофина. При ПМДД делеции в гене дистрофина в большинстве случаев приводят к сдвигу рамки считывания и преждевременной терминации трансляции, при этом синтез белка прекращается. При ПМДБ структурные перестройки гена не меняют рамку считывания, ДНК-полимераза может «перескакивать» делетированные экзоны, что приводит к синтезу внутренне усеченного белка, в какой-то мере способного выполнять свои функции.

Кодируемый геном белок (дистрофин) относится к семейству спектрин/актиновых мембранных белков цитоскелета и состоит из четырех доменов. Основная функция дистрофина заключается в обеспечении устойчивости и эластичности мышечного волокна при последующих мышечных сокращениях. Это обеспечивается специфической локализацией и строением дистрофина (рис. 22.2.). Располагаясь под сарколеммой мышечного волокна в виде переплетенного антипараллельного димера, дистрофин своим N-концом связан с цитоплазматическим актином, а С-концом с комплексом мембранных гликопротеинов. Дистрофин-ассоциированный комплекс представляет собой наиболее важный элемент мышечного цитоскелета, который обеспечивает взаимодействие структур экстра- и интрацеллюлярного матрикса, участвует в регуляции уровня кальция в мышце и в передаче импульсов через мембрану мышечного волокна. При отсутствии дистрофина мембрана разрушается, в ней появляются участки некроза. По мере развития болезни мышечное волокно практически полностью разрушается и замещается соединительнотканными структурами, что приводит к псевдогипертрофии мышц – увеличению их объема при утрате или значительном ослаблении функциональных возможностей.

Первые признаки прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшенна появляются в возрасте 1–5 лет. Для большинства больных характерна задержка темпов раннего моторного развития. При начале самостоятельной ходьбы (в возрасте старше 14 мес) отмечаются частые падения, двигательная неловкость, быстрая утомляемость. Постепенно походка становится переваливающейся, возникают затруднения при подъеме по лестнице и из положения на корточках. У больных развивается псевдогипертрофия различных мышц, прежде всего икроножных, дельтовидных, четырехглавых и трехглавых, что создает ложное впечатление атлетического телосложения

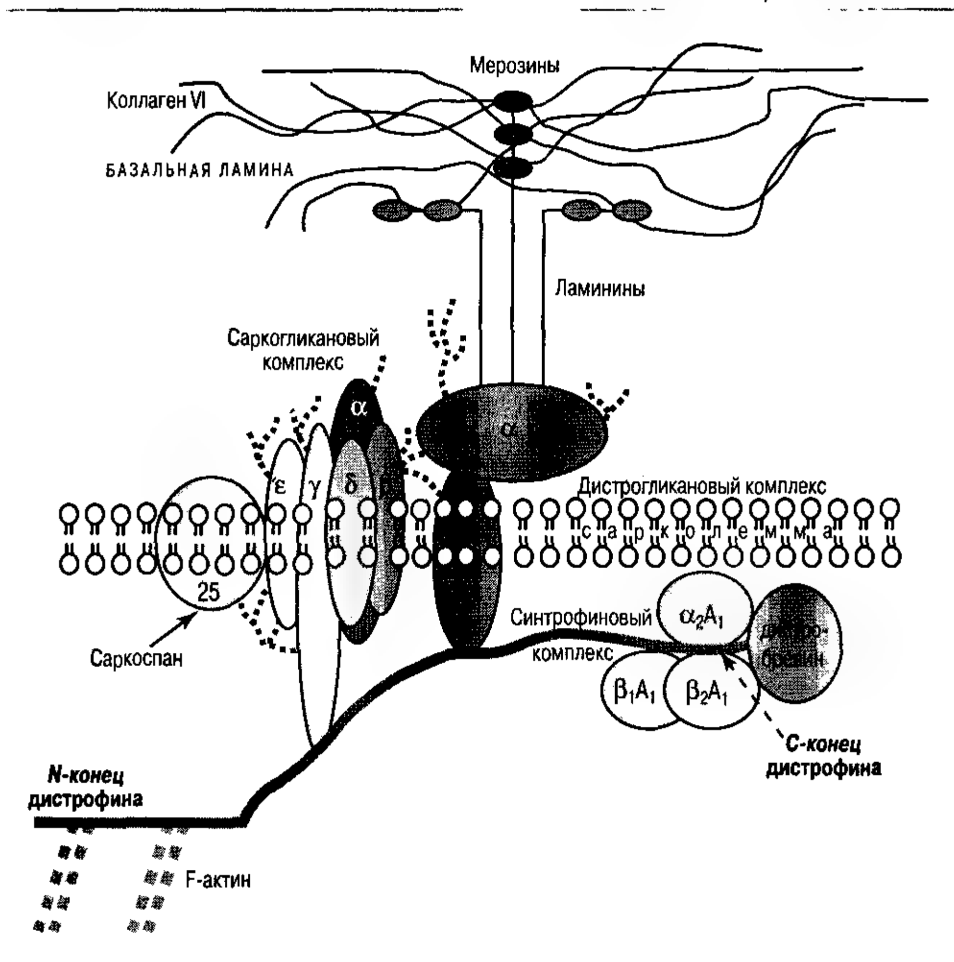


Рис. 22.2. Расположение дистрофина и дистрофин-ассоциированных белков на мембране мышечного волокна

больного. По мере прогрессирования заболевания псевдогипертрофия мышц трансформируется в гипотрофию. Распространение патологического процесса имеет восходящий характер. Первыми поражаются мышцы тазового пояса и проксимальных отделов нижних конечностей, затем мышцы плечевого пояса, спины и проксимальных отделов верхних конечностей. Уже на ранних стадиях болезни снижаются или угасают сухожильные рефлексы. По мере развития патологического процесса в мышцах возникают вторичные деформации позвоночника (усиление лордоза и кифоза, сколиоз), грудной клетки (по типу седловиной и килевидной) и стоп, а также ретракции сухожилий с развитием контрактур в суставах. Еще один характерный признак – кардиомиопатия, которая проявляется симптомами гипертрофии левого желудочка и аритмией. У 25–30% больных диагностируется олигофрения в степени дебильности.

Пациенты сохраняют способность к самостоятельной ходьбе до 10–12 летнего возраста, после чего пользуются инвалидной коляской. Гибель больных наступает от сердечной недостаточности или от интеркуррентных инфекций до 25-летнего возраста.

Прогрессирующая мышечная дистрофия Бекера манифестирует в возрастном интервале от 10 до 20 лет с появления слабости и утомляемости мышц тазового пояса и ног. Ранними симптомами у значительного числа больных бывают болезненные мышечные спазмы. Клинические проявления сходны с таковыми при ПМДД, однако выражены слабее. При ПМДБ, так же как и при ПМДД, в патологический процесс вовлечен миокард. Гипертрофическая или дилятационная кардиомиопатия диагностируется у 50–60% больных. В 40–50% случаев выявляются гипогенитализм и атрофия яичек. Интеллект, как правило, не страдает. Заболевание прогрессирует достаточно медленно и в большинстве случаев приводит к инвалидизации больного не ранее 40-летнего возраста.

Высокую диагностическую значимость при обоих вариантах заболевания имеет активность специфичного для мышечной ткани фермента – креатинфосфокиназы в плазме крови больного. Этот показатель у больных ПМДД в 50–100 раз превышает норму и может быть выявлен до возникновения выраженных клинических признаков.

Для диагностики и дифференциальной диагностики ПМДД/ПМДБ применяются иммуногистохимические методы анализа дистрофина в биоптате мышечного волокна. При использовании антител к различным доменам дистрофина при ПМДД иммунореактивные формы белка, как правило, не выявляются. У больных с ПМДБ наблюдается прерывистое окрашивание мышц при иммунохимическом анализе, что свидетельствует об относительной сохранности отдельных структур цитоскелета.

Одним из основных методов ДНК-диагностики ПМДД/ПМДБ является *детекция делеций* одного или нескольких экзонов гена дистрофина, которые обусловливают не менее 60% всех случаев заболевания. Учитывая значительную протяженность гена дистрофина, для упрощения поиска делеций вся его кодирующая часть, начиная с 5′-конца, поделена на 9 субфрагментов, размером 1 т.п.н., каждый из которых может быть использован в качестве ДНК-зонда. Наиболее часто используется метод мультиплексной амплификации. При ДНК-диагностике применяют набор нуклеотидных последовательностей наиболее часто мутирующих участков гена и кэп-сайта. Использование набора из 18 пар праймеров для амплификации экзонов, расположенных в основном в 3′- и 5′-концах гена дистрофина, позволяет выявить примерно 98% всех крупных делеций. Метод мультиплексной амплификации прост и не требует длительного времени для проведения анализа. Особое достоинство метода – наличие внутреннего положительного контроля почти в каждом образце, так как делеция одновременно всех амплифицируемых участков встречается крайне редко. Пример диагностики делеций в гене дистрофина представлен на рис. 22.3. Если делецию зарегистрировать не удается, поиск дупликаций и точковых мутаций в гене, осуществляется крайне редко, что связано со значительной протяженностью гена дистрофина. В этом случае диагноз основывается на использовании данных клинико-генеалогического, биохимического и иммуногистохимического методов обследования больного. При необходимости проведения пренатальной диагностики и выяв-

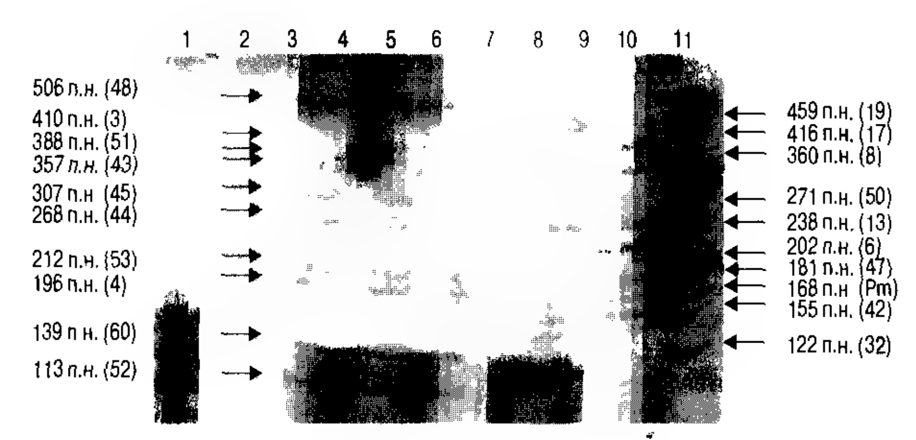


Рис. 22.3. Диагностика делеций в гене дистрофина. (Из: ООО «Центр Молекулярной генетики»/Лаборатория ДНК-диагностики МГНЦ РАМН, 2001)

На данной электрофореграмме представлены результаты амплификации промоторной области и 19 экзонов гена дистрофина. Дорожка 1 – маркер молекулярной массы λ/PstI, дорожки 2-6 – МПА1: 2 - отрицательный контроль, 3 - положительный контроль, 4 – делеция 3–4 экзонов, 5 – делеция 43 экзона, 6 – делеции нет, дорожки 7-11 – МПА2: 7 – отрицательный контроль, 8 – положительный контроль, 9 – делеция 6 экзона, 10 – делеция 19–32 экзонов, 11 – делеции нет

ления гетерозиготных носительниц поврежденного гена среди родственниц больного используются косвенные методы ДНК-диагностики, принципы которых изложены в гл. 19. В настоящее время клонировано большое количество как внутри-, так и внегенных зондов, позволяющих обнаружить информативный полиморфизм в 99% семей больных с ПМДД/Б. Однако даже при использовании внутригенных маркеров ошибка метода составляет около 5%, что обусловлено возможностью рекомбинации между полиморфным локусом и мутантным участком гена. Наибольшая информативность косвенных методов ДНК-диагностики ПМДД/ПМДБ может быть достигнута при использовании трех зондов, один из которых внутригенный (центральный), а два фланкируют ген с разных сторон. Точность оценки возрастает в случае отсутствия рекомбинации между фланкирующими и центральным маркерами.

22.1.1.2. СИНДРОМ ТЕСТИКУЛЯРНОЙ ФЕМИНИЗАЦИИ (СТФ) (OMIM: 300068)

Термин «тестикулярная феминизация» был впервые введен Моррисом для обозначения заболеваний, сопровождающихся женским строением наружных половых органов и наличием яичек. СТФ обусловлен мутациями в гене рецептора к дигидротестостерону (андрогенового рецептора, АР), локализованном на хромосоме Xq11-12 и состоящим из 8 экзонов. Как правило, это миссенс- или нонсенс-мутации, приво-

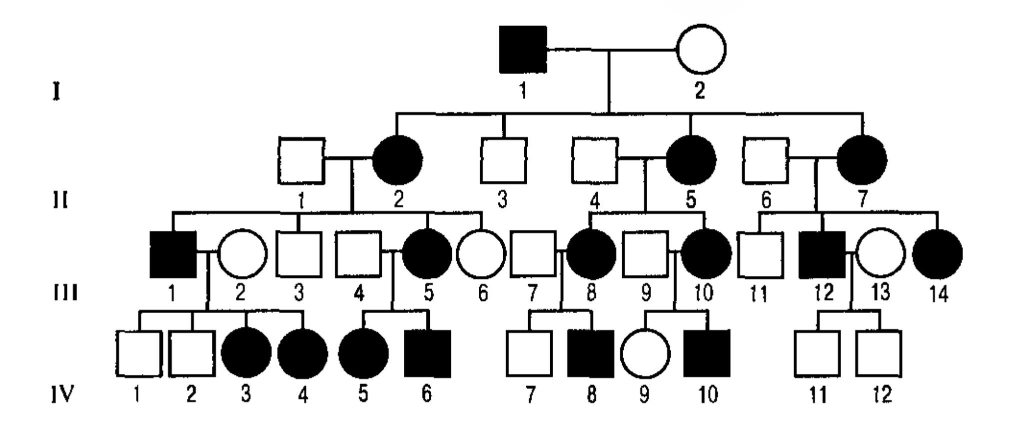
дящие к образованию терминирующего кодона. Интересно отметить, что другой тип мутаций в гене АР – экспансия тринуклеотидных CAG-повторов в первом экзоне гена – приводит к возникновению Х-сцепленного рецессивного нервно-мышечного заболевания – *спинально-бульбарной мышечной атрофии Кеннеди*, которая также может сопровождаться атрофией яичек, олигоспермией, мужским бесплодием, а также гинекомастией.

Клинически инверсия пола при СТФ проявляется наличием ложного мужского гермафродитизма у лиц с кариотипом 46,XY. Гонады больных имеют двойственное строение. Наружные половые органы сформированы по женскому типу, однако влагалище заканчивается слепо, а матка и яичники отсутствуют. Половые железы представлены яичками, которые часто располагаются внутрибрюшинно, в половых губах или паховом канале, формируя при этом грыжевое выпячивание. Яички, располагающиеся в несвойственных им местах, часто имеют тенденцию к озлокачествлению к возрасту старше 30 лет. Молочные железы обычно хорошо развиты, однако, подмышечное и лобковое оволосение скудное. Телосложение и психосексуальное поведение больных соответствует женскому.

Помимо полной формы СТФ, характеризующейся отсутствием чувствительности андрогеновых рецепторов, выделяют неполные варианты, при которых чувствительность рецепторного комплекса снижена в результате уменьшения количества рецепторов на поверхности клеток-мишеней или их связывающей способности. Эти варианты объединены в группу синдромов нечувствительности к андрогенам (*AIS-androgen insensitivity syndrome*). Клинические проявления неполных форм разнообразны, фенотип больных, как правило, мужской, но сопровождается различной степенью гипоплазии половых органов, крипторхизмом, гипоспадией, расщеплением мошонки и нарушением процессов сперматогенеза.

22.1.2. ХАРАКТЕРИСТИКА Х-СЦЕПЛЕННОГО ДОМИНАНТНОГО ТИПА НАСЛЕДОВАНИЯ

Х-сцепленный доминантный тип наследования встречается крайне редко и точно установлен лишь для нескольких заболеваний. В этом случае мутантный ген локализован в Х-хромосоме и может проявляться как в гетерозиготном, так и гемизиготном состоянии. При анализе родословных с сегрегацией заболевания в нескольких поколениях в ряде случаев очень трудно отличить Х-сцепленный доминантный тип от аутосомно-доминантного наследования. В обоих случаях наблюдается передача заболевания от родителей к детям, а фенотипические проявления имеют как гетерозиготы, так и гомозиготы по патологической мутации. Для установления типа наследования информативны лишь те семьи, в которых передача заболевания происходит через больных отцов. В этом случае наблюдается избирательное поражение потомков женского пола – все дочери таких больных заболеют, так как получат от отца Х-хромосому, несущую патологический ген, а все сыновья будут здоровы, так как унаследуют от отца Y-хромосому. При передаче заболевания от больных матерей соотношение больных и здоровых потомков составляет 1:1, также как и при аутосомно-доми-



ис. 22.4. Родословная с Х-сцепленным доминантным типом наследования

антном типе наследования. Еще одна особенность Х-сцепленных доминантных олезней заключается в разной тяжести клинической картины у больных женского мужского пола. У гетерозиготных по мутации женщин часто обнаруживается неолная пенетрантность и умеренно выраженная экспрессивность патологического :на. Довольно распространено среди них бессимптомное носительство, что можно бъяснить коррегирующим эффектом генов интактной Х-хромосомы. У больных ужчин тяжесть заболевания значительнее, в ряде случаев носители мутации мужкого пола гибнут еще во внутриутробном периоде. Это приводит к тому, что при некоэрых Х-сцепленных доминантных заболеваниях больные мужского пола встречаются райне редко. В группе больных с Х-сцепленными доминантными заболеваниями соношение лиц женского и мужского пола составляет примерно 2:1. Родословная с Х-цепленным доминантным типом наследования представлена на рис. 22.4.

В качестве примера Х-сцепленного доминантного заболевания рассмотрим один з вариантов наследственных моторно-сенсорных нейропатий.

22.1.2.1. НАСЛЕДСТВЕННАЯ МОТОРНО-СЕНСОРНАЯ НЕЙРОПАТИЯ 1Х-ТИПА (OMIM: 302800)

Іервые семью с Х-сцепленной доминантной нейропатией описал Херрингэм в 889 г. Сцепление заболевания с маркерами области Xq13-21 выявил Гал с соавт. в 993 году. В том же году Бергоффен и Фишбек обнаружили у больных точковые муации в гене коннексина-32 (GJB1), продемонстрировав тем самым этиологическую оль этого гена в возникновении заболевания.

Ген заболевания локализован в области Xq13.1. Основной тип мутаций — точковые (миссенс и нонсенс): их в настоящее время идентифицировано более 240. В редких случаях выявляются делеции и инсерции. Установлено, что тяжесть клинических проявлений зависит от типа мутации. Симптомы заболевания при миссенс-мутациях выражены менее резко, чем при нонсенс-мутациях и делециях. Наиболее тяжелая клиническая картина среди больных с миссенс-мутациями выявляется в том случае, если эти мутации нарушают функционирование четвертого домена белка или затрагивают некодирующие участки гена (промоторной области и 5'-нетранслируемой области). Описана семья с НМСН IX-типа, несущая крупную делецию, в результате которой белок почти не экспрессируется, однако, клинические проявления выражены умеренно.

Продукт гена — белок коннексин-32 — локализован в некомпактном миелине и является белком межклеточных контактов, обеспечивающим функционирование ионных каналов глии. Шесть коннексинов образуют коннексон, функции которого заключаются в обеспечении трофики осевого цилиндра и нормальной скорости прохождения импульса по миелиновой оболочке периферического нерва. При ряде мутаций в гене полностью выпадает функция белка, как в цитоплазме, так и на поверхности клетки.

Клинические проявления варьируют в зависимости от пола и типа мутационного повреждения в гене. Для мужчин характерны более раннее начало и выраженные симптомы болезни. Первые признаки, выражающиеся в слабости перонеальной группы мышц, слабости и деформации стоп, а также изменении походки, появляются у них в в возрасте от 10 до 20 лет. Расстройства поверхностной и глубокой чувствительности возникают у 75% больных мужского пола; особенность этого варианта заболевания состоит в раннем и выраженном снижении проприоцептивной чувствительности. На ранних стадиях заболевания может отмечаться гиперестезия стоп. Сухожильные рефлексы начинают угасать в самом начале болезни, причем, первым выпадает ахиллов рефлекс (его отсутствие выявляется у 100% больных). Снижение коленного рефлекса обнаруживается у 90% больных мужчин и у 50% женщин. Поражение рук развивается спустя 2–17 лет от начала болезни и характеризуется слабостью межкостных мышц и деформацией кистей по типу когтистой или обезьяньей лапы.

Достаточно часто у больных выявляется тремор пальцев вытянутых рук и фасцикуляции мышц, что свидетельствует о вовлечении в процесс мотонейронов спинного мозга. У 80% больных мужчин регистрируются симптомы сенситивно-мозжечковой атаксии. При точковой мутации *ARG142GLU* часто отмечается нейросенсорная тугоухость.

Клинические проявления заболевания у женщин обнаруживаются позже и значительно менее выражены. Часто симптомы заболевания выявляются только при клиническом осмотре или при проведении электронейромиографического обследования. Наиболее типичны для женщин – тремор пальцев вытянутых рук, снижение сухожильных рефлексов ног (особенно, ахиллового) и чувствительные нарушения.

Диагностика заболевания осуществляется на основании данных клинического осмотра, свидетельствующих о поражении периферических нервов; по результатам электронейромиографического обследования (снижение скоростей проведения им-

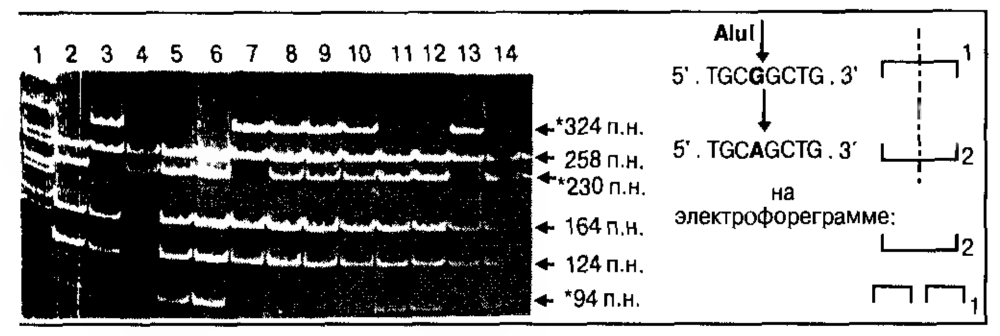


Рис. 22.5. Результаты ДНК-диагностики мутации *G553A* в гене *Cx32* при НМСН 1 X типа методом SSCP (Из: ООО «Центр Молекулярной генетики»/ Лаборатория ДНК-диагностики МГНЦ РАМН,2001)

Диагностика проведена методом амплификации 2-го экзона (длина амплификата 892 п.н.) с последующей рестрикцией рестриктазой AluI

Дорожка 1 - маркер молекулярной массы, дорожка 4 - ДНК-больного отсутствуют фрагменты длиной в 164п.н. и 124п.н (рестриктаза разрезает по G-нуклеотиду – появляются короткие фрагменты и не действует на А-нуклеотид - короткие фрагменты отсутствуют)

ульса по периферическим нервам) и молекулярно-генетического анализа (SSCP-нализ и прямое секвенирование). Пример обнаружения точковых мутаций на основании SSCP-анализа представлен на рис. 22.5.

22.1.3. ХАРАКТЕРИСТИКА Y-СЦЕПЛЕННОГО (ГОЛАНДРИЧЕСКОГО) ТИПА НАСЛЕДОВАНИЯ

Моногенные заболевания, для которых установлен Y-сцепленный тип наследования, встречаются относительно редко. Данный тип наследования характеризуется олько прямой передачей признака от отца к сыну.

В настоящее время идентифицировано около 100 генов, локализованных в Y-ромосоме. Большинство из них обусловливают развитие организма по мужскому ипу, участвуют в сперматогенезе и контроле роста тела и зубов. Мутации в некотоых генах приводят к развитию рака яичек, простаты и другим гонадобластомам.

Все гены Y-хромосомы можно разделить на три группы.

Первую группу составляют гены псевдоаутосомных областей, идентичные в X- и '- хромосомах. Мутации в генах этой группы нарушают коньюгацию гоносом в ужском мейозе, приводя к бесплодию.

Вторая группа включает 10 X-Y-гомологичных генов, локализованных в нереомбинирующих областях Yp и Yq. Эти гены экспрессируются во многих тканях и рганах, включая яички и простату.

Третью группу составляют 11 Y-специфичных генов, располагающихся в нереомбинирующих областях Yp и Yq. Продукты этих генов могут играть роль транс-

крипционных факторов и цитокиновых рецепторов, выполнять функции протеинкиназ и фосфатаз. Некоторые из этих генов формируют так называемый AZF-регион, микроделеции в котором часто приводят к мужскому бесплодию: в 10%–15% случаев вследствие азоспермии, а в 5%–10% олигоспермии тяжелой степени.

Y-сцепленные заболевания, как правило, возникают вследствие мутаций de novo. Мальчики, которые получили от своего отца мутацию, нарушающую развитие и функционирование мужских гонад, оказываются стерильными и не могут передать ее своему потомству, поэтому родословные оказываются неинформативными. Однако описаны семьи, в которых Y-микроделеция наследовалась. В ряде таких случаев размер микроделеции у бесплодного сына был больше, чем у его отца. Это может быть связано с высокой нестабильностью Y-хромосомы вследствие наличия большого числа различных повторов, мобильных генетических элементов, а также аберрантной рекомбинации между гомологичными областями X- и Y-хромосом или несбалансированными обменами между сестринскими хроматидами Y-хромосомы.

22.2. МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ БОЛЕЗНИ

Митохондриальные болезни – большая группа наследственных заболеваний, обусловленных нарушением структуры и биохимических процессов в митохондриях. Убедительные данные об этиологической роли мутаций в митохондриальной ДНК (мтДНК) при наследственных заболеваниях человека были получены в 1988 г.

Митохондрии - внутриклеточные органеллы, присутствующие в каждой клетке человека (кроме зрелых эритроцитов) в виде нескольких сотен копий. Их назначение – обеспечивать клетки энергией. Основные химические реакции в митохондриях происходят на внутренней митохондриальной мембране, площадь которой многократно увеличена по сравнению с внешней мембраной за счет крист (гребней), выступающих в пространство матрикса. Еще в 1963 г. было установлено, что митохондрии, в отличие от других клеточных органелл, имеют свой собственный геном, представленный единственной кольцевой хромосомой длиной в 16569 п.н. (гл. 15). Существует ряд особенностей строения и функционирования мтДНК по сравнению с ядерным геномом. Прежде всего, это – отсутствие интронов, вследствие чего наблюдается высокая плотность и значительное уменьшение промежутков между генами по сравнению с ядерной ДНК. Кроме того, большинство митохондриальных мРНК не содержат 5′- и 3′-нетранслируемые последовательности. Внутренняя и внешняя цепи митохондриальной хромосомы имеют разную плотность и обозначаются как H – тяжелая цепь и L – легкая цепь. Митохондриальная ДНК имеет D-петлю, которая представляет собой ее регуляторную область. В D-петле локализован участок начала репликации для H-цепи. Синтез H-цепи происходит по часовой стрелке вокруг мтДНК, после прохождения 2/3 цепи начинается репликация L-цепи, которая происходит против часовой стрелки, т.е. в обратном по отношению к H-цепи направлении. Таким образом, репликация мтДНК предсталяет собой двухступенчатый асинхронный процесс. Выявлены также отличия генетического кода мтДНК от ядерной ДНК. В митохондриальном коде кодон AUA кодирует

етионин, а не изолейцин, ядерный стоп-кодон UGA кодирует триптофан, а триплеты GA и AGG, кодирующие аргинин в ядерной ДНК, являются терминирующими.

22.2.1. ЭТИОЛОГИЯ И ПАТОГЕНЕЗ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

оказано, что мтДНК содержит гены, которые кодируют 13 полипептидов, входя- (их в пять комплексов дыхательных цепей митохондрий, 22 гена транспортной НК и 2 гена рибосомной РНК. Синтез остальных 70 белков, участвуюших в процес- іх окислительного фосфорилирования, находится под контролем ядерных генов. аким образом, наследственные заболевания, обусловленные нарушениями энерге- ических процессов в митохондриях, могут быть детерминированы мутациями как в итохондриальном, так и ядерном геноме. При мутациях в ядерных генах отклоне- ий от менделевских типов наследования не происходит описаны митохондриаль- ые заболевания с аутосомно-доминантным и аутосомно-рецессивным типом на- ледования. Отклонения от менделевских законов типичны для заболеваний, обу- овленных мутациями в митохондриальном геноме. К настоящему времени описа- о три типа мутаций в митохондриальной ДНК – крупные делеции и точковые му- ации структурных и синтетических генов. Необходимо упомянуть еще один генети- еский механизм возникновения митохондриальных заболеваний, который обозна- ается как *межгеномные сигнальные эффекты*. Известно, что синтез митохондриаль- ой ДНК находится под контролем ядерных генов. Мутации в этих генах могут при- ести к изменению количества копий митохондриальной ДНК и возникновениюеномена деплеции (истощения) митохондрий. Таким образом, все митохондриальные олезни на основе различий в этиологии можно разделить на три большие группы:

1) заболевания, обусловленные мутациями в генах ядерной ДНК;
2) заболевания связанные с мутациями в митохондриальном геноме;
3) заболевания вызванные нарушением межгеномных сигнальных эффектов.

В настоящее время достаточно хорошо изучен патогенез митохондриальных бо- езней. Это стало возможным благодаря нашим знаниям биохимических процессов, роисходящих в митохондриях.

Показано, что для обеспечения клетки энергией, необходимы: транспорт суб- гратов, их окисление, цикл трикарбоновых кислот, функционирование дыхатель- ых цепей митохондрий и сопряжение окисления и фосфорилирования. Начальным тапом биохимических процессов является транспорт субстратов через мембрану итохондрий. Избирательная проницаемость мембраны достигается благодаря су- ществованию транспортных белков – транслоказ, которые служат переносчиками икарбоновых кислот, АТР и ADP, ионов кальция, глутамата и др. Основными суб- гратами митохондрий являются пируват и жирные кислоты, транспорт которых существляется с помощью карнитин-пальмитоил–трансферазы и карнитина. Сле- ующий этап – окисление субстратов – происходит под действием ферментов пиру- ат-дегидрогеназного комплекса, состоящего из трех ферментов: пируват-дегидро- еназы, липоат-ацетилтрансферазы и липоамид-дегидрогеназы. В результате этих

реакций образуется ацетил-СоА, который и включается в цикл трикарбоновых кислот. Утилизация жирных кислот происходит многоступенчато и осуществляется в процессе β-окисления. В ходе этих реакций образуются электроны, которые переносятся в дыхательную цепь митохондрий. Центральный же путь утилизации углеродсодержащих молекул, приводящих к полному разложению пирувата в аэробных условиях, осуществляется через цикл Кребса. В результате этого цикла также образуются молекулы NAD и FAD, передающие свои электроны в дыхательную цепь митохондрий. Дыхательная цепь митохондрий состоит из пяти мультиферментных комплексов, четыре из которых осуществляют транспорт электронов, а пятый катализирует синтез АТР. Комплексы дыхательных цепей митохондрий находятся под двойным генетическим контролем как со стороны митохондриального, так и ядерного генома.

Таким образом, с точки зрения патогенеза можно выделить три основные группы митохондриальных болезней, которые обусловлены нарушением:

1) β-окисления жирных кислот, включая карнитиновый цикл;
2) метаболизма пирувата и цикла трикарбоновых кислот;
3) процессов окислительного фосфорилирования.

На основании суммирования этиологических и патогенетических факторов создана современная классификация митохондриальных заболеваний. В соответствие с этой классификацией выделяют три основные группы митохондриальных болезней, которые в свою очередь, включают несколько подгрупп.

1. *Болезни, обусловленные дефектами мтДНК*:

а) точковыми мутациями

б) делециями

в) изолированными дупликациями или в сочетании с делециями

2. *Болезни, обусловленные дефектами ядерной ДНК*:

а) мутациями, нарушающими работу электронтранспортной цепи митохондрий;

б) мутациями, нарушающими окислительное фосфорилирование;

в) мутациями, вызывающими дефекты ферментов цикла Кребса;

г) мутациями, нарушающими утилизацию субстратов;

д) мутациями, нарушающими транспорт субстратов.

3. *Болезни, обусловленные дефектами мтДНК, которые вызваны нарушением ядерной ДНК*:

а) тканеспецифическими делециями или дупликациями мтДНК;

б) истощением (деплецией) мтДНК.

В данном разделе будут рассмотрены только те митохондриальные заболевания, которые обусловлены мутациями в митохондриальном геноме, так как именно для них характерен нетрадиционный тип наследования.

22.2.2. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ МУТАЦИЯМИ В МИТОХОНДРИАЛЬНОМ ГЕНОМЕ

Для митохондриальных заболеваний, обусловленных мутациями в митохондриальном геноме, характерны следующие общие закономерности.

1. *Материнский тип передачи.* В настоящее время показано, что все митохондрии человека имеют материнское происхождение и получены человеком с материнской яйцеклеткой. Митохондрии, находящиеся в сперматозоиде, используются им для энергетического обеспечения его проникновения в яйцеклетку. Таким образом, при наличии мутации в том или ином количестве митохондрий яйцеклетки мать может передать мутантные митохондрии свом детям обоего пола.

2. *Феномен гетероплазмии.* Клетки больного с митохондриальной патологией содержат мутантные и нормальные митохондрии, распределение которых происходит случайно при клеточном делении.

3. ***Зависимость тяжести клинических проявлений от характера мутационного повреждения митохондриального генома, содержания мутантной мтДНК в клетке, а также от энергетической потребности различных органов и тканей.*** По чувствительности к недостатку энергетического субстрата органы можно расположить (в порядке убывания) следующим образом: центральная нервная система, скелетные мышцы, сердечная мышца, почки, печень, эндокринная система. Необходимо отметить, что тяжесть митохондриальных заболеваний прогрессирует с возрастом, что объясняется увеличением числа спонтанно возникающих мутаций в митохондриальной ДНК в процессе старения организма.

4. *Высокая частота спорадических случаев.* Скорость мутирования митохондриальной ДНК в 6 17 раз выше, чем ядерной ДНК, что обусловливает высокую частоту спорадических случаев митохондриальных заболеваний и определяет значительную роль мутаций митохондриального генома в возникновении хронических прогрессирующих и дегенеративных заболеваниях человека. Показано, что одной из причин возникновения биоэнергетической недостаточности и слабости сердечной мышцы у людей с 24-летнего возраста являются мутации: прежде всего, делеции в митохондриальном геноме.

22.2.2.1. ОСНОВНЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Митохондриальные заболевания характеризуются значительным разнообразием клинических проявлений. Описаны различные сочетания следующих клинических признаков:

1) повторные коматозные состояния, сопровождающиеся ацидозом крови и увеличением концентрации кетоновых тел;

2) задержка физического развития, нанизм;

3) дисфункция щитовидной железы;

4) симптомы поражения различных отделов нервной системы (судороги, атаксия, полинейропатия, атетоз, изменение мышечного тонуса и др.);

5) миопатии и кардиомиопатии;

6) тубулопатии, витамин-D-резистентный рахит;

7) диарея, целиакие-подобный синдром;

8) печеночная недостаточность;

9) атрофия зрительных нервов;

10) панцитопения, макроцитарная анемия.

Вариации клинических проявлений митохондриальной патологии могут быть обусловлены как описанным выше эффектом гетероплазмии, так и различной чувствительностью органов к недостатку кислорода. Так, в клетках печени клинические проявления могут отсутствовать даже при 80%-ном содержании мутантных митохондрий, в то время как нормальное функционирование клеток мозга при таких условиях было бы невозможно.

22.2.2.2. БИОХИМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Основные биохимические маркеры митохондриальных заболеваний следующие:

1) увеличение концентрации лактата в крови – лактат-ацидоз, особенно усиливающийся при нагрузке глюкозой или физическими упражнениями;

2) гиперкетонемия, в том числе парадоксальная, и гиперкетонурия;

3) нарушение соотношения лактат/пируват в крови;

4) повышение концентрации ацетоацетата и 3-ОН-бутирата.

Определение этих метаболитов должно быть обязательным этапом биохимической диагностики митохондриальных заболеваний. Однако при интерпретации результатов исследования необходимо учитывать следующие моменты:

1) повышение концентрации этих метаболитов не дает основания однозначно диагностировать наследственное митохондриальное заболевание;

2) диагностическая ценность этих показателей выше после пищевой нагрузки, чем натощак;

3) эти показатели неравнозначны при различных митохондриальных заболеваниях. Очень ценным диагностическим тестом может быть определение концентрации лактата на фоне глюкозной кривой – проведение этого теста дает дополнительную нагрузку на дыхательную цепь митохондрий и может выявить ее несостоятельность.

Для проведения более точной диагностики митохондриальных заболеваний необходимо проводить измерение активности ферментов дыхательной цепи митохондрий в различных тканях. Наиболее удобным является определение активности этих ферментов в биоптате мышечного волокна, так как уровни нормальной активности ферментов дыхательной цепи митохондрий в мышцах значительно выше, чем в других тканях. Возможно определение различных ферментов дыхательной цепи митохондрий, однако наибольшую диагностическую значимость имеют лишь несколько из них: цитрат-синтетаза, сукцинат-дегидрогеназа и *цитохром*-с-оксидаза.

Для заболеваний, обусловленных мутациями в митохондриальном геноме характерны специфические морфологические изменения в биоптате мышц – наличие, так называемых, «рваных красных волокон», которые часто обозначаются английской аббревиатурой RRF (от англ. *riger red fibres*). При окраске биоптата по Гомори выявляется специфическая структура волокон, напоминающая разрывы по периферии. Показано, что этот феномен обусловлен очаговым скоплением по периферии мы-

шечного волокна, под сарколеммой, пролиферирующих генетически измененных митохондрий. Митохондрии резко увеличены в размерах, содержат дезорганизованные кристы и аномальные паракристаллические или осмофильные включения. Наиболее часто такие волокна обнаруживаются при мутациях в генах тРНК, приводящих к нарушению синтеза белков внутри митохондрий.

22.2.3. КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОСНОВНЫХ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В качестве примеров, демонстрирующих особенности проявления и течения митохондриальных заболеваний, рассмотрим несколько синдромов: 1) возникающих в результате крупных делеций или точковых мутаций в мтДНК, 2) характеризующихся перестройками в мтДНК, которые обусловлены мутациями в ядерном геноме.

22.2.3.1. СИНДРОМ КЕРНС-СЕЙРА (СКС) (OMIM: 530000)

Заболевание было впервые описано в 1958 г. Большинство случаев обусловлено крупными делециями в мтДНК протяженностью от 2 до 10 т.п.н. Наиболее часто размер делеции составляет 4977 п.н. Очень редко клинические проявления заболевания сопровождаются дупликациями или точковыми мутациями в митохондриальном геноме. Большинство описанных случаев – спорадические, что можно объяснить как высокой частотой мутирования митохондриальной ДНК, так и ограниченной способностью к оплодотворению ооцитов, содержащих крупные делеции в ДНК митохондрий. Предполагается, что наиболее часто делеции возникают в митохондриях соматических клеток в период раннего эмбрионального развития. Более чем 50% больных с СКС одновременно с делецией имеют дупликацию D-петли мтДНК, унаследованную ими от матери. Наличие такой дупликации, по-видимому, предрасполагает к появлению делеции. Еще одним фактором, дестабилизирующим митохондриальный геном, могут быть шпилечные структуры, образованные граничащими с делециями последовательностями мтДНК. Аномально слившиеся в результате делеции гены могут транскрибироваться, но не способны к трансляции; таким образом, кодируемые ими белки в организме больного отсутствуют.

Первые симптомы заболевания появляются в возрасте от 4 до 20 лет и включают триаду симптомов: 1) офтальмоплегию, характеризующуюся опущением верхнего века (птозом) и ограничением движений глазных яблок; 2) прогрессирующую слабость мышц проксимальных отделов конечностей; 3) пигментную дегенерацию сетчатки. По мере прогрессирования болезни к описанным симптомам присоединяются признаки поражения сердца, в виде нарушения ритма, атриовентрикулярной блокады, расширения желудочков, а также нейросенсорная глухота, атрофия зрительных нервов, эндокринные нарушения. Характерно возникновение симптомов поражения мозжечка в виде атаксии и дизартрии. У некоторых больных постепенно сни-

жается интеллект. Смерть больных наступает спустя 10–20 лет после начала заболевания от сердечно-сосудистой недостаточности.

При проведении лабораторных исследований выявляются маркеры, типичные для митохондриальных заболеваний - лактат-ацидоз и повышение концентрации 3-ОН-бутирата в крови, а также феномен «рваных красных волокон» в биоптате мышечного волокна. Точная диагностика заболевания осуществляется на основе анализа мтДНК и обнаружения крупной делеции. Однако при проведении молекулярно-генетического анализа с диагностическими целями следует иметь в виду описанный выше эффект гетероплазмии и учитывать, что в клетках крови содержится лишь около 5% мутантной мтДНК. Наиболее достоверные и точные результаты могут быть получены при молекулярно-генетическом исследовании биоптата мышц, в которых при этом заболевании обнаруживается не менее 70% мутантной ДНК митохондрий. Кроме того, необходимо иметь в виду, что с возрастом количество мутантной ДНК в тканях, в том числе и мышечной, нарастает и у больных более старшего возраста вероятность обнаружения мутаций в мтДНК при исследовании биоптата мышц увеличивается.

Трансформацию эффекта гетероплазмии можно продемонстрировать при описании еще одного митохондриального заболевания, - *синдрома Пирсона* . Для него, также как и для СКС, характерно наличие крупных делеций в мтДНК, однако, преимущественно локализованных в митохондриях клеток костного мозга. Клинические проявления возникают в первые дни после рождения и характеризуются злокачественной сидеробластной анемией, а в ряде случаев, панцитопенией (угнетением всех кроветворных ростков костного мозга) и инсулинзависимым сахарным диабетом, возникающим в результате фиброза поджелудочной железы. Большинство больных с этим синдромом погибает в первые 1–2 года жизни, однако, у тех, кого удается спасти путем частых и интенсивных гемотрансфузий, спустя несколько лет может развиться СКС в результате увеличения содержания мутантной мтДНК в мышечных и нервных клетках больного.

22.2.3.2. СИНДРОМ MELAS (митохондриальная энцефалопатия, лактат-ацидоз и инсультоподобные эпизоды) (OMIM:540000)

Синдром MELAS – заболевание, обусловленное точковыми мутациями в митохондриальной ДНК. Возраст начала заболевания широко варьирует от младенческого до взрослого, однако наиболее часто первые признаки обнаруживаются в возрасте от 5 до 15 лет. В большинстве случаев болезнь дебютирует инсультоподобными эпизодами, злокачественными мигренями или задержкой психомоторного развития. Наиболее часто инсульты локализуются в височной, теменной или затылочной долях головного мозга, сопровождаются гемипарезом и гемианопсией и имеют тенденцию к быстрому восстановлению. Причиной возникновения инсультов является *митохондриальная ангиопатия, характеризующаяся избыточной пролиферацией митохондрий* в стенках артериол и капилляров сосудов мозга. По мере прогрессирования за-

болевания, на фоне рекуррентного характера инсультов нарастает неврологическая симптоматика – у больного возникают мышечная слабость, судороги, миоклонии, атаксия и нейросенсорная тугоухость. В небольшом проценте случаев помимо неврологической симптоматики возникают эндокринные расстройства в виде сахарного диабета и гипофизарного нанизма.

Диагностика этого заболевания, также как и при СКС и синдроме Пирсона, проводится с использованием биохимического, морфологического и молекулярно-генетического методов. Наиболее частой мутацией в мтДНК является однонуклеотидная замена A → G в 3243-ем положении. Эта мутация приводит к инактивации транскрипционного терминатора, заключенного внутри гена тРНК Leu. Таким образом, последствием этой мутации является изменение транскрипционного соотношения рРНК и мРНК и снижение эффективности трансляции. Вторая по частоте мутация, приводящая к возникновению синдрома MELAS – замена T → C в 3271-ом положении мтДНК.

22.2.3.3. СИНДРОМ МНОЖЕСТВЕННЫХ ДЕЛЕЦИЙ мтДНК (OMIM: 550000)

Синдром множественных делеций мтДНК наследуется в соответствии с менделевскими закономерностями, наиболее часто по аутосомно-доминантному типу. Характерный признак этих заболеваний – наличие делеций нескольких участков мтДНК, обусловливающих нарушение структуры и функционирования ряда митохондриальных генов. Механизм возникновения этих нарушений до конца не выяснен. Возможно в его основе лежит возникновение мутаций в ядерных регуляторных генах, контролирующих репликацию мтДНК. Мутации в этих генах могут либо облегчать процесс возникновения перестройки мтДНК, либо снижать активность факторов, распознающих или элиминирующих спонтанно возникающие перестройки. В настоящее время картировано три таких гена – в области хромосом 10q 23.3-24, 3p14.1-21 и 4q35 однако, идентифицирован только один – который кодирует фермент аденин-нуклеотид-транслоказу 1, снижение концентрации которой приводит к нарушению метаболизма аденина и нарушению процессов репликации.

Клинические проявления заболеваний, обусловленных множественными делециями мтДНК, очень полиморфны, возникают во 2–3 десятилетии жизни, и характеризуются вовлечением многих систем организма (нервной, эндокринной, мышечной, глаз и др.). Наиболее часто у больных наблюдается наружная офтальмоплегия (нарушение нормальных движений глазных яблок), генерализованная миопатия, периферическая полинейропатия, поражение слуховых и зрительных нервов, катаракты, снижение роста, гипопаратиреоз. Для заболевания характерен лактат-ацидоз и феномен «рваных красных волокон» в мышечных биоптатах.

22.3. БОЛЕЗНИ ГЕНОМНОГО ИМПРИНТИНГА (БГИ)

Еще одной группой заболеваний с нетрадиционным типом наследования являются болезни, в основе развития которых лежит феномен геномного импринтинга – различной экспрессии у потомства гомологичных генов, полученных от отца или матери. Термин «импринтинг» в генетике был впервые использован Г. Кроузом в 1960 г. для объяснения элиминации хромосом отцовского происхождения у насекомых. Известно, что для большинства известных генов человека характерна двухаллельная экспрессия. Однако существует ряд генов, локализованных в, так называемых, импринтинговых участках, для которых показана моноаллельная экспрессия, т.е. экспрессируется только отцовский или только материнский аллель, а другой оказывается функционально неактивным. Избирательная супрессия тех или иных генов возникает при их трансмиссии через женские или мужские половые клетки. Таким образом, под геномным импринтингом понимают эпигенетический процесс, приводящий к стойким функциональным различиям экспрессии гомологичных генов, полученных от одного из родителей. Показано, что основную роль в возникновении геномного импринтинга играет избирательное метилирование цитозиновых оснований ДНК в процессе спермато- или оогенеза, в результате которого прекращается транскрипция генов импринтингового региона.

В настоящее время хорошо известно влияние ряда отцовских и материнских генов на вес плода, степень развития плаценты и другие особенности внутриутробного развития. Наличие генов, подверженных импринтингу, четко установлено для хромосом 7, 11, 15. Предполагается, что такие гены присутствуют и в хромосомах 2, 3, 6, 14 и 20. К настоящему моменту идентифицировано не менее 30 импринтированных генов, часто группирующихся в кластеры. По некоторым данным таких генов не менее 100.

22.3.1. ЭТИОЛОГИЯ И ПАТОГЕНЕЗ БОЛЕЗНЕЙ ГЕНОМНОГО ИМПРИНТИНГА

К настоящему времени идентифицировано несколько механизмов возникновения БГИ.

1. *Однородительская дисомия (ОРД)* – наличие у больного двух хромосом с импринтинговыми участками, полученными от одного из родителей. В этом случае человек имеет нормальный кариотип (46 хромосом), однако, обе хромосомы одной из пар получены им от одного из родителей. Причин возникновения ОРД несколько, но наиболее вероятны из них четыре: а) нерасхождение хромосом во втором мейотическом делении с образованием совершенно идентичных хроматид; б) нерасхождение хромосом в первом делении мейоза с возникновением негомологичных хромосом; в) исправление возникшей при делении клеток трисомии или моносомии но

хромосомам, содержащим импринтированные гены; г) соматическая рекомбинация хромосом, т.е. обмен между несестринскими хроматидами гомологичных хромосом в соматических клетках.

2. *Хромосомные перестройки в импринтинговых участках*, содержащих экспрессирующиеся гены. Наиболее распространены микроделеции, выявляемые специальными цитогенетическими методами (прежде всего FISH-анализом), а также транслокации и инверсии определенного хромосомного региона.

3. *Точковые мутации в генах импринтинговых регионов.*

4. *Делеции в области импринтинговых центров, контролирующих процессы метилирования хромосом.*

22.3.2. КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОСНОВНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ГЕНОМНОГО ИМПРИНТИНГА

Наиболее часто эффект геномного импринтинга выступает в качестве этиологического фактора при мутациях в хромосоме 15. Показано, что при наличии ОРД хромосомы 15 материнского происхождения или делеции сегментов хромосомы 15q11-13 отцовского происхождения возникает синдром Прадера–Вилли, в то время как ОРД этой хромосомы отцовского происхождения или делеция сегментов q11-13 на 15-й хромосоме, полученной от матери, приводят к появлению синдрома Энгельмана. Для демонстрации различий фенотипических проявлений, особенностей генетических механизмов возникновения и профилактики этих синдромов приводим их краткие характеристики.

22.3.2.1. СИНДРОМ ПРАДЕРА-ВИЛЛИ (СПВ) (OMIM: 176270)

Заболевание впервые описано в 1956 г. Причиной его развития является инактивация генов области q11-13 хромосомы 15 отцовского происхождения. Известно, что вовлеченные в процесс гены этого региона на материнской хромосоме супрессированы и транскрипционно не активны. Два из них идентифицированы – это ген *SNRPN*, продуктом которого является малый ядерный рибонуклеопротеин, участвующий в альтернативном сплайсинге мРНК, и ген белка некдина. В этой области имеются, по крайней мере, еще пять генов, функции которых до конца не установлены. Подавляющее большинство случаев заболевания спорадические (т.е. возникли вследствие новой мутации) и обусловлены тремя механизмами: делецией сегментов q11-13 в отцовской хромосоме 15, ОРД по материнской хромосоме и изменением структуры импринтингового региона данной хромосомы. Наиболее часто, у 70% больных, обнаруживаются микроделеции, в 25% случаев возникает ОРД при получении обеих хромосом 15 от матери, около 4% случаев обусловлено нарушением регуляции процесса импринтинга. Лишь в 1% случаев заболевание связано с наличием сбалансированной транслокации в отцовской хромосоме 15, протекающей с вовлечением этого критического региона.

Клинические проявления СПВ отличаются разнообразием и модифицируются по мере течения болезни. Выделяют две группы клинических признаков — те, которые наблюдаются до трехлетнего возраста, и появляющиеся в старшем возрасте. Первые признаки заболевания возникают с рождения. Главные среди них — мышечная гипотония, трудности вскармливания и малый вес при рождении. Нередко матери отмечают слабое шевеление плода во внутриутробном периоде. Иногда до шестимесячного возраста у ребенка наблюдается повышенная сонливость или даже приступы летаргии. У ряда больных возникают приступы апноэ во сне. Психомоторное развитие замедлено. Для всех больных характерна дисморфия — широкий бифронтальный диаметр, миндалевидный разрез глаз, опущенные углы рта (рис. 22.6). К 6-месячному возрасту трудности вскармливания исчезают, и у ребенка возникает гиперфагия. Усиление аппетита приводит к быстрой прибавке в весе и ожирению. Наиболее интенсивное отложение жира наблюдается в проксимальных отделах конечностей, на бедрах и животе. Избыточный вес и нарушение обмена веществ часто провоцируют развитие сахарного диабета. Рост больных в большинстве случаев низкий, их кисти и стопы широкие и короткие. У 1/3 пациентов отмечается гипопигментация кожи, часто обнаруживается снижение чувствительности к боли. Характерным симптомом является гонадотропный гипогонадизм (гипоплазия полового члена у мужчин и малых и больших половых губ у женщин) половое развитие больных, как правило, отстает от нормы. Все больные страдают олигофренией различной степени, у них снижены когнитивные функции, обучение в школе этих детей невозможно.

Рис. 22.6. Синдром Прадера–Вилли. (*Из:* R.F. Mueller, I.D. Young, 2001)

Для диагностики вариантов СПВ применяют различные цитогенетические и молекулярно-генетические методы. В табл. 22.1 представлены методы диагностики

Таблица 22.1. **Методы диагностики СПВ, используемые при различных генетических механизмах его возникновения**

Количество больных, %	Генетический механизм	Метод диагностики	Риск для сибсов пробандов
70	Делеция 15q11-q13	ДНК-анализ или FISH	<1%
25	Однородительская дисомия	ДНК-анализ	>1%
<5	Дефект регуляции процесса импринтинга	ДНК-анализ	50%
<1	Сбалансированная транслокация	Анализ кариотипа	<1%

ПВ, используемые при различных генетических механизмах заболевания, а также иск повторных случаев в отягощенных семьях.

Как следует из таблицы наибольший повторный риск свойствен тем семьям, в торых патология связана с нарушением регуляции импринтинга за счет мутации в мпринтинговом центре или в локусе мишени. Лишь в этих случаях в отягощенных мьях показано проведение дородовой диагностики. При других механизмах пато-и ии дородовая диагностика у сибсов больного не проводится в связи с низким риском возникновения заболевания.

22.3.2.2. СИНДРОМ ЭНГЕЛЬМАНА (СЭ) (OMIM:105830)

овершенно другая клиническая картина возникает при заболевании, впервые опи-нном Г. Энгельманом в 1965 г. Этиологическими факторами заболевания, также ак и при синдроме Прадера–Вилли, является наличие ОРД и аномалий хромосо-ного участка 15q11-q13, однако, в данном случае структурные перестройки локали-ованы в материнской хромосоме, а ОРД имеет отцовское происхождение. Показа-о, что у 68% больных патология обусловлена наличием 3–5 Мб делеции в области 5 q11-13, у 7% – ОРД, 11% случаев связаны с мутацией находящегося в этом регио-е гена *UBE3A* (ubiquitin protein ligase 3A), в 3% случаев болезнь – результат дефекта мпринтингового центра, а в 11% случаев этиология заболевания не установлена.

Болезнь проявляется грубой задержкой психомоторного развития, выраженной лигофренией и недоразвитием речи. Больные поздно начинают ходить и имеют воеобразную походку (на широко расставленных ногах с согнутыми в локтевых суставах руками), напоминающую движения механической куклы. Типичным проявлением заболевания являются приступы насильственного немотивированного смеха. Сочетание этих двух симптомов привело к тому, что СЭ часто называют «синдромом лица счастливой куклы» (рис. 22.7.). У ряда больных к указанным выше симптомам присоединяются судороги, выраженные расстройства координации движений, мышечная гипотония, косоглазие. В некоторых случаях имеет место гипопигментация волос и кожи.

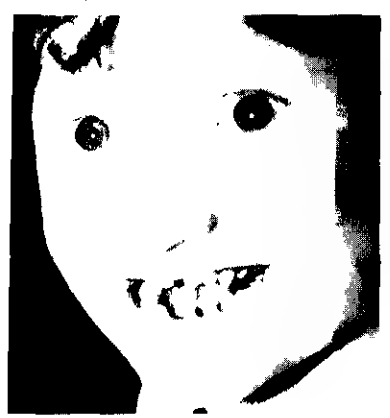


Рис. 22.7. Синдром Энгельмана. (Из:R.F. Mueller, I.D. Young, 2001)

Для точной диагностики СЭ используют те же молекулярно-генетические и цитогенетические методы, что и при СНВ. Они позволяют судить об этиологии 89% случаев заболевания. Если выявленный у пробанда этиологический фактор СЭ коррелирует с высоким повторным риском, возможно проведение дородовой диагностики.

22.4. БОЛЕЗНИ ЭКСПАНСИИ ТРИНУКЛЕОТИДНЫХ ПОВТОРОВ (БЭТП)

22.4.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Болезни экспансии тринуклеотидных повторов (БЭТП) – достаточно большой класс наследственных заболеваний, объединенных на основе общности молекулярного механизма – наличия, так называемых, «динамических мутаций», характеризующихся увеличением числа копий тандемных тринуклеотидных повторов в регуляторной или транслируемой части генов. Такой тип мутаций обнаружен пока только в генах человека и не встретился ни у одного из видов млекопитающих или других хорошо изученных живых организмов. Показано, что для некоторых генов в норме характерно наличие определенного числа тринуклеотидных повторов, причем, для каждого из них существует определенный количественный интервал популяционной изменчивости, при этом число повторов в нормальных аллелях может варьировать от нескольких десятков до нескольких сотен. Появление клинических признаков наблюдается лишь тогда, когда количество повторов превысит критический для данного гена уровень. Возникновение этих мутаций – двухступенчатый процесс. На первом этапе происходит увеличение количества повторов выше характерного для популяции уровня при прохождении клетки через мейоз. Для одних заболеваний характерно увеличение количества повторов в мейозе женских половых клеток, для других – в мужских, для третьих – такой зависимости не выявлено. Таким образом, на первом этапе возникает аллель гена, содержащий увеличенное по сравнению с нормой количество тринуклеотидных повторов, но не достаточное для развития заболевания. Это состояние принято называть «*премутацией*». Содержащий такую «премутацию» аллель становится нестабильным, что в ряде случаев приводит к возникновению полной мутации – увеличению количества повторов до критического уровня, необходимого для развития заболевания. Механизмы возникновения этого типа мутаций до конца не изучены. Предполагается, что они могут быть результатом нарушения функции ДНК-полимеразы во время репликации ДНК в митозе или мейозе.

Общие клинико-генетические характеристики БЭТП следующие:

1) *антиципация*, т.е., утяжеление клинических проявлений заболевания из поколения в поколение в пределах одной родословной. Увеличение тяжести клинической картины проявляется как более ранним возрастом манифестации и быстрым про-

рессированием заболевания, так и появлением более тяжелых симптомов у потомков пораженных. Феномен антиципации объясняется нарастанием количества тринуклеотидных повторов в цикле мейотических и митотических клеточных делений. Для одних заболеваний, например хореи Гентингтона, антиципация наблюдается при передаче заболевания от отца к детям (увеличение количества повторов в мужском мейозе), для других, например миотонической дистрофии, – при передаче гена через матерей (появление более протяженной экспансии в женском мейозе);

2) *корреляция между тяжестью клинических проявлений и количеством тринуклеотидных повторов в различных семьях и у больных в одной и той же семье;*

3) *парадокс Шермана* – возможность увеличения количества пораженных лиц в каждом последующем поколении в зависимости от того, кто из родителей передал мутацию потомкам. Возникновение этого феномена обусловлено наличием здоровых носителей «премутации», у которых экспансия тринуклеотидных повторов не достигла порога, необходимого для возникновения клинических симптомов. Этот парадокс был впервые выявлен при анализе родословных больных с синдромом Мартина–Белл, характеризующегося ломкостью X-хромосомы, и он будет рассмотрен при описании этого заболевания.

БЭТП имеют не только общие черты, но и некоторые различия, обусловленные типом и локализацией тринуклеотидных повторов в структуре генов. На основании этих патогенетических различий можно выделить две группы заболеваний.

Первую группу составляют болезни, при которых возникает экспансия CAG-повторов, кодирующих глутамин *в транслируемой части гена*, что приводит к включению в структуру экспрессируемого им белка полиглутаминового тракта. Экспансия тринуклеотидных повторов при этой группе заболеваний относительно невелика и их количество у больных колеблется в интервале от 40 до 80. При этом транскрипция и трансляция мутантных генов не нарушена, а патология возникает, по-видимому, в результате неправильного функционирования увеличенного в размере белка. Продукты экспрессии этих генов обнаруживаются в различных тканях и органах, что позволяет предполагать их значительную роль в ядерно-белковых и белок-белковых взаимодействиях. Все описанные в настоящее время заболевания этой группы представляют собой наследственные нейродегенерации, характеризующиеся поздним началом и неуклонным прогрессированием. К таким заболеваниям можно отнести хорею Гентингтона и различные варианты спино-церебеллярных атаксий.

Вторую группу составляют заболевания, при которых экспансия тринуклеотидных повторов возникает *в нетранслируемой части гена*. В этом случае для появления клинических симптомов необходима бóльшая, чем в первой группе БЭТП, экспансия повторов (от нескольких сотен до нескольких тысяч), а характер клинических проявлений и темп прогрессирования болезни зависит от функции мутантного белка. Столь резкое увеличение количества тринуклеотидных повторов делает ген нестабильным, как в соматических, так и в половых клетках, что приводит к возникновению феномена антиципации в родословных больных. К заболеваниям этой группы можно отнести миотоническую дистрофию, синдром Мартина–Белл и атаксию Фридрейха.

В последние годы описано одно заболевание – окулофарингеальная миопатия, возникновение которого связано с коротким участком экспансии GCG-повторов,

кодирующих аминокислоту аланин, в первом экзоне гена PABP 2 (поли-А-связывающего белка). Это приводит к увеличению полиаланинового участка в N-концевой части белковой молекулы и ее олигомеризации с образованием внутриядерных включений. Показано, что у 98% здоровых людей имеется 6 таких тринуклеотидных повторов и лишь у 2% обнаруживается 7 GCG-повторов в гене. У больных окулофарингеальной миопатией количество повторов варьирует от 8 до 13 и в большинстве случаев равно 9. Особенность наследования этого заболевания заключается в том, что при возникновении различного сочетания аллелей гена *PABP 2* у больных может наблюдаться как аутосомно-доминантный, так и аутосомно-рецессивный типы наследования. Аутосомно-доминантный вариант имеет место при наличии аллеля, содержащего более 7 GCG-повторов (наиболее часто больные являются гетерозиготами по аллелю с 9 повторами). Сочетание аллелей GCG-7/GCG-9 вызывает более тяжелую клиническую картину, чем комбинация аллелей GCG-6/GCG-9. Аутосомно-рецессивный тип наследования заболевания регистрируется у гомозигот по аллелям GCG-7 и GCG-9. Из приведенного примера следует, что межаллельные взаимодействия у человека могут обусловливать различные типы наследования одного и того же заболевания. Кроме того, определенный аллель (в данном случае это аллель GCG-7) может выступать в роли модификатора тяжести течения болезни.

Приводим клинико-генетическую характеристику нескольких наиболее распространенных болезней экспансии тринуклеотидных повторов.

22.4.2. КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НЕКОТОРЫХ БЭТП

22.4.2.1. ХОРЕЯ ГЕНТИНГТОНА (ХГ) (OMIM: 143100)

Заболевание впервые описано английским врачом Гентингтоном в 1861 году. Распространенность его составляет от 4 до 10 на 100 000 в различных популяциях. Тип наследования аутосомно-доминантный с полной пенетрантностью мутантного гена. Ген картирован в области хромосомы 4p16.3, содержит 67 экзонов и кодирует белок с молекулярной массой 348 кДа, который получил название «гентингтин». Функции этого белка окончательно не выяснены. Показано, что в первом экзоне гена у здоровых людей обнаруживается от 6 до 32 тандемных CAG-повторов. Заболевание возникает при увеличении количества таких повторов до 36-180, при этом показана достоверная корреляция между количеством повторов и возрастом начала болезни, а также между числом триплетов и темпами прогрессирования заболевания. В результате такой мутации в кодирующей части гена синтезируется удлиненный белок с наличием полиглутаминового трека. Учитывая, что основные морфологические изменения при ХГ обнаруживаются в подкорковых ядрах центральной нервной системы, предполагается, что в этих структурах происходит формирование полиглутамин-опосредованных связей между гентингтином и другими белками нервной системы, что приводит к образованию амилоидоподобных агрегатов и гибели нейронов стрио-палли-

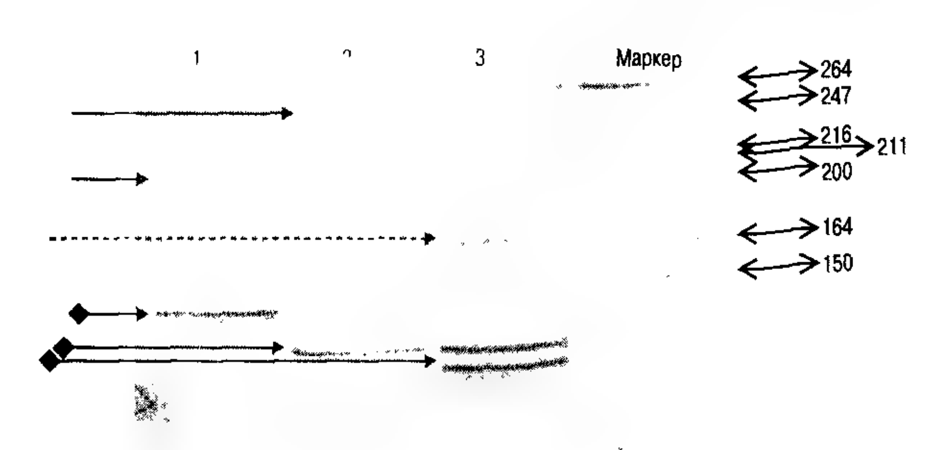


Рис. 22.8. ДНК-диагностика хореи Гентингтона. (Из: ООО «Центр Молекулярной генетики»/ Лаборатория ДНК-диагностики МГНЦ РАМН, 2001)

Фрагмент электрофореграммы при диагностике количества CAG-повторов в гене гентингтина. Дорожки 1 и 2 - ДНК больных хореей Гентингтона, 3 - здоровый контроль. В качестве маркера молекулярной массы использована ДНК фага λ, рестрицированная PstI. Длины указаны справа от геля. Стрелками указаны аллели:

◆→ - содержащие нормальное количество повторов CAG;

→ - содержащие увеличенное количество повторов CAG (экспансия);

·····→ - гетеродуплексы, образующиеся при наличии двух нормальных аллелей.

В норме число CAG-повторов составляет 11–35, что соответствует длине амплифицируемых фрагментов – 104–176 п.н.; при хорее Гентингтона число CAG-повторов колеблется в пределах 38–87, что соответствует длине амплифицируемых фрагментов 185–332 п.н.

дарной системы. В зависимости от особенностей клинических проявлений выделяют два варианта заболевания – гиперкинетический и акинетико-ригидный. Первые признаки классического, *гиперкинетического* варианта ХГ возникают в 4–5 десятилетии жизни; заболевание характеризуется триадой признаков – хореическими гиперкинезами, деменцией (слабоумием) и психическими нарушениями. Болезнь неуклонно прогрессирует, приводя к смерти больных спустя 15–20 лет. Другой вариант болезни, составляющий не более 10% от всех случаев заболевания – *акинетико-ригидный*, возникает в молодом возрасте (в 1–2 десятилетии жизни) и проявляется мышечной ригидностью, контрактурами, дрожанием рук, атаксией, миоклонией и пирамидными симптомами. Хореические гиперкинезы при этой форме заболевания могут полностью отсутствовать. Возникновение этой формы болезни (называемой вариантом Вестфаля) наблюдается только при передаче заболевания от отца. При наследовании заболевания по мужской линии, особенно, если это происходит в нескольких поколениях, наблюдается феномен антиципации, характерный для болезней экспансии тринуклеотидных повторов и связанный с увеличением их количества в мейозе мужских половых клеток.

Диагностика заболевания осуществляется на основании типичных клинических проявлений и молекулярно-генетического анализа. ДНК-диагностика проводится с

помощью ПЦР-анализа на основании изучения характера амплификации первого экзона гена. Диагноз подтверждается при идентификации удлиненного фрагмента ДНК на электрофореграмме. Пример ДНК-диагностики ХГ с помощью прямого метода ДНК-анализа представлен на рис. 22.8.

Возможно проведение дородовой и пресимптоматической диагностики наличия мутации у родственников пробандов с высоким риском развития болезни. Это представляется очень важным, учитывая поздний возраст начала заболевания. Безусловно, выявление носительства у здоровых родственников пробанда, не достигших возраста манифестации заболевания, порождает многочисленные этические, юридические и социальные проблемы (гл. 25).

22.4.2.2. МИОТОНИЧЕСКАЯ ДИСТРОФИЯ КУРШМАНА-ШТЕЙНЕРТА-БАТТЕНА (OMIM: 160900)

Заболевание впервые описано Г.И. Россолимо в 1901 г. и относится к числу распространенных наследственных болезней человека. В различных популяциях его частота колеблется от 1 до 8 случаев на 40 тысяч населения.

Заболевание наследуется по аутосомно-доминантному типу. В основе его этиологии лежит экспансия тринуклеотидных CTG-повторов в 3'-нетранслируемой области гена. Ген, обозначаемый как DMPK, картирован на хромосоме 19 q13.2-q13.3 и содержит 15 экзонов. В норме количество CTG-повторов в регуляторной части гена колеблется от 5 до 37. Число повторов у больных миотонической дистрофией варьирует от 50 до 2000. Отмечена корреляция между количеством CTG-повторов и тяжестью клинической картины. Так при мягких формах болезни количество повторов колеблется от 50 до 80, при формах с поздним началом – от 100 до 500, при врожденных вариантах болезни – от 500 до 2000. Такие различия в количестве тринуклеотидных повторов свидетельствуют о значительной нестабильности этого участка. Показано, что увеличение количества повторов возникает главным образом в процессе мейоза в женских гаметах. Таким образом, для этого заболевания характерен геномный импринтинг, который проявляется различиями в тяжести течения заболевания в зависимости от того, от кого из родителей унаследовано заболевание. При передаче мутантного гена через матерей отмечается более тяжелое течение болезни и возникновение врожденных форм.

Экспрессируемый геном белок – миотонин-протеинкиназа – относится к семейству серин/треонин-протеинкиназ и состоит из 624 аминокислот. Считается, что этот белок играет важную роль в регуляции клеточной дифференцировки и репликации ДНК. Существует три изоформы миотонин-протеинкиназы в скелетных мышцах, образующихся в результате альтернативного сплайсинга.

В качестве одного из наиболее вероятных патогенетических механизмов миотонической дистрофии рассматривается влияние CTG-повторов на посттранскрипционную модификацию мРНК гена. Возможно, происходит нарушение различных этапов процессинга мутантного РНК продукта или транспорта мРНК из ядра в цитоплазму. Другим патогенетическим механизмом может быть нарушение укладки нук-

леосом из-за наличия участков экспансии тринуклеотидных повторов, изменяющих локальную структуру хромосомы.

Заболевание встречается в двух клинических вариантах: классическом с поздним началом и врожденном. В основе клинических особенностей этих вариантов заболевания лежат различия в количестве тринуклеотидных повторов в гене.

Рис. 22.9. Больной с миотонической дистрофией Куршмана Штейнерта–Баттена. (Из: Baraitser M , 1985)

Классическая форма. Заболевание манифестирует в широком возрастном диапазоне – от 5 до 35 лет, и характеризуется сочетанием симптомов миопатии, миотонии, сердечно-сосудистых, эндокринно-вегететивных нарушений и катаракты.

Миотонические признаки проявляются в виде миотонических спазмов и миотонических механических реакций, возникающих, например, при ударе неврологическим молоточком. Миотонические спазмы возникают преимущественно в сгибателях пальцев кистей и жевательной мускулатуре. По мере развития заболевания симптомы миотонии уменьшаются и в поздних стадиях заболевания могут полностью исчезнуть.

Симптомы миопатии характеризуются слабостью и атрофиями различных мышечных групп. Наиболее часто процесс локализуется в мышцах лица, грудино-ключично-сосцевидной мышце, надостных, подостных и височных мышцах (рис. 22.9). В ряде случаев в процесс вовлекаются глазодвигательные мышцы. Кожные покровы лица обычно имеют сероватый оттенок. Лицо больного приобретает маскообразное, печальное выражение. По мере прогрессирования заболевания отмечается поражение бульбарных мышц, что клинически проявляется возникновением дисфонии, затруднением глотания. Атрофические процессы в скелетной мускулатуре наиболее выражены в дистальных отдела конечностей. Атрофические процессы и миотонические спазмы могут возникать в дыхательной мускулатуре, что приводит к ограничению движения грудной клетки и снижению вентиляции легких, артериальной гипоксии, возникновению аспирационной пневмонии, а также приступов апноэ во сне.

У 50% больных возникают сердечно-сосудистые нарушения, главным образом в виде симптомов нарушения проводимости и гипертрофии желудочков.

Эндокринные нарушения характеризуются гипогонадизмом, азооспермией и снижением либидо у мужчин и нарушением менструального цикла, гирсутизмом и ранним климаксом у женщин.

Характерным симптомом является облысение, сопровождающееся изменением структуры волос. У мужчин наибольшее выпадение волос отмечается в области лба и висков, для женщин характерно гнездное или диффузное облысение.

У значительного числа больных возникают поражения глаз в виде катаракты, блефарита, конъюнктивита, помутнения роговицы.

Часто у больных выявляется дисморфия в строении скелета и лицевого черепа, а также изменения дерматоглифики. У 30% больных отмечается незначительное нарушение интеллекта в виде снижения IQ.

Врожденная форма. Эта форма заболевания возникает исключительно у потомков пораженных матерей и обусловлена увеличением количества тринуклеотидных повторов в гене в процессе женского мейоза.

Первые признаки заболевания заметны еще во внутриутробном периоде, они выражаются в резком снижении двигательной активности плода. С рождения у детей отмечается диффузная мышечная гипотония с преимущественным поражением жевательной, мимической и глазодвигательной мускулатуры и дистальных отделов конечностей. Характерными проявлениями заболевания являются расстройства дыхания и трудности вскармливания ребенка. В период новорожденности в клинической картине преобладает миопатический синдром, особенностью которого является сохранность или даже повышение сухожильных рефлексов. Признаки миотонии, как правило, присоединяются позднее. Характерна задержка моторного развития и олигофрения. Заболевание достаточно быстро прогрессирует, часто приводит к внезапной смерти больных в раннем возрасте. Типичным морфологическим дефектом в мышцах является выраженное уменьшение размеров мышечных волокон первого типа и значительное увеличение размеров волокон второго типа. В центре мышечных волокон определяются саркоплазматические включения, имеющие вакуолизированные ядра, а под сарколеммой обнаруживаются специфические агрегаты тубул в виде пчелиных сот.

Диагностика заболевания осуществляется на основании анализа клинической картины, наличия специфических признаков на электронейромиограмме и ДНК-анализа. В настоящее время успешно осуществляется профилактика этого заболевания в отягощенных семьях, направленная как на выявление носителей мутации на доклинической стадии среди родственников больных, так и на дородовую диагностику.

22.4.2.3. СИНДРОМ ЛОМКОЙ Х-ХРОМОСОМЫ, ИЛИ СИНДРОМ МАРТИНА-БЕЛЛ (СМБ) (OMIM: 309550, 309548)

Заболевание впервые описано в 1943 году. Это самый распространенный синдром, сопровождающийся умственной отсталостью у мужчин. Его частота в различных популяциях колеблется от 16 до 25 на 100 000 лиц мужского пола.

Основной этиологический фактор заболевания, выявленный у 99% больных, — увеличение количества тринуклеотидных CGG-повторов в нетранслируемой области первого экзона гена *FMR 1*, содержащего 17 экзонов и локализованного в хромосоме Xq27.3. Этот протяженный повтор расположен дистальнее CpG-островка на расстоянии 250 п.н. Все элементы, необходимые для нормальной экспрессии гена располагаются в пределах хромосомного участка, длиной в 2,8 т.п.н., перекрывающего 5'-область первого экзона, содержащего CGG-повторы. Число таких повторов у здоровых индивидуумов может колебаться от 6 до 200. Возникновение мутации в ге-

не представляет собой двухступенчатый процесс. На первом этапе число повторов увеличивается до уровня, превышающего критический для данной популяции. Это состояние обозначается как *премутация*. В случае СМБ премутацией считают количество повторов, превышающее 56. *Полная мутация* характеризуется наличием 200 и более тринуклеотидных повторов. Носители премутации имеют повышенный риск рождения больного ребенка с полной мутацией в гене, приводящей к возникновению клинических признаков СМБ. Необходимо отметить, что переход премутации гена в полную мутацию при данном заболевании возникает только в женском мейозе. При этом уровень экспансии повторов находится в зависимости от пола потомка — он заметно выше у сыновей, чем у дочерей женщин-носительниц. В качестве объяснения этого феномена рассматривается возможность взаимодействия в зиготе нормального и мутантного генов *FMR 1* двух Х-хромосом. До настоящего времени остается неясной причина возникновения феномена экспансии CGG-повторов в гене *FMR 1*. Предполагается существование нескольких механизмов — неравный кроссинговер, аномальная рекомбинация в локусе Х-хромосомы, содержащем ген *FMR1*, а также потеря негомологичных AGG-триплетов, которые в норме разделяют цепочку монотонных повторов. Увеличение количества CGG-повторов выше определенного уровня происходит вблизи CpG-островков, что приводит к возникновению гиперметилирования всей GC-насыщенной регуляторной области гена и вызывает полный блок его транскрипции в результате супрессии его промотора. Описан мозаичный вариант СМБ, появление которого связано с экспансией CGG-повторов в небольшом клеточном клоне. Таким образом, патогенез заболевания имеет несколько звеньев:

1) экспансия тринуклеотидного CGG-повтора в первом экзоне гена;
2) избыточное метилирование CpG-островка этого гена;
3) подавление экспрессии белкового продукта гена.

Ключевым звеном патогенеза следует считать гиперметилирование гена. Механизм возникновения этого феномена окончательно не установлен.

Наряду с этим выявлена генетическая гетерогенность СМБ, связанная как с полилокусностью, так и полиаллелизмом. Показано, существование аллельных вариантов заболевания, обусловленных наличием точковых мутаций и делеций гена *FMR1*. Кроме того, у больных с клиническими проявлениями СМБ в Х-хромосоме выявлено еще два фолат-чувствительных ломких сайта, находящихся на расстоянии 500 т.п.н. и 1,5–2 млн.п.н. от известного ломкого сайта, содержащего ген *FMR1*. Механизм мутаций в двух генах, идентифицированных в этих ломких сайтах и обозначенных *FRAXE* и *FRAXF*, сходен с таковым при классической форме СМБ и обусловлен экспансией GCC- и CGG-повторов с метилированием CpG-островков. Отличием двух редких вариантов СМБ от классического является увеличение количества тринуклеотидных повторов, как в женском, так и в мужском мейозе.

Показано, что основным патогенетическим механизмом классического варианта заболевания служит отсутствие нуклеоцитоплазматического белка FMR1 (от англ. *fragile mental retardation*), осуществляющего челночную функцию и связывающего различные мРНК В частности, этот белок участвует в формировании комплекса, необходимого для осуществления процессов трансляции в рибосомах.

Клинические проявления заболевания характеризуются триадой признаков:

1) олигофренией (IQ больных составляет 35–50);

2) дисморфией (прогнатизм, оттопыренные ушные раковины; (рис. 22.10);

3) макроорхидизмом, выявляемым после периода полового созревания.

У 80% больных обнаруживается пролапс митрального клапана. Однако полная форма СМБ встречается только у 60% пораженных, у 10% больных выявляется только умственная отсталость, в остальных случаях имеет место различная комбинация симптомов.

Рис. 22.10. Больной с синдромом *фрагильной (ломкой)* хромосомы (синдром Мартина–Белл). (Из: R.F. Mueller, Young, 2001)

Тип наследования этого заболевания наиболее близок к X-сцепленному доминантному, однако, имеет ряд особенностей, обозначаемых как парадокс Шермана. Он заключается в том, что вероятность развития основного признака заболевания – умственной отсталости – зависит от положения индивида в родословной. Проиллюстрируем это на примере родословной, представленной на рис. 22.11. При анализе родословной становится очевидным, что появление заболевания у членов третьего поколения трудно интерпретировать с точки зрения моногенного типа наследования. Объяснить этот феномен удалось после проведения молекулярно-генетического обследования всех членов родословной и установления их генотипов. Показано, что I_1 является носителем премутации в гене *FMR1*, который передал ее своим дочерям II_2 и II_4. Женщины-носители премутации здоровы, однако имеют высокий риск рождения ребенка с СМБ. При этом пораженными могут быть дети обоего пола. Это может быть обусловлено двумя механизмами. Наиболее вероятный из них – характерное для этого заболевания увеличение числа тринуклеотидных повторов в мейозе женских половых клеток. В этом случае вероятность перехода премутации в мутацию зависит от количества CGG-повторов в гене *FMR1*. Риск рождения ребенка с СМБ у носительниц премутации представлен в табл. 22.2.

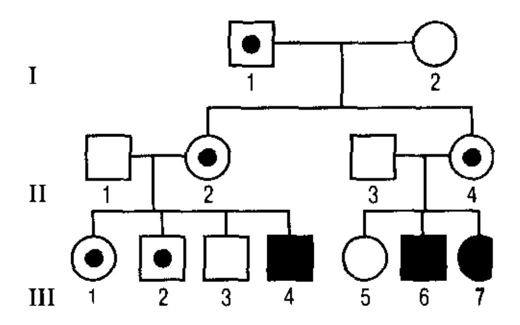


Рис. 22.11. Родословная семьи отягощенной заболеванием, обусловленным экспансией тринуклеотидных повторов при локализации гена в X-хромосоме (иллюстрирует парадокс *Шермана)*

Показано также, что только 50% всех женщин носителей полной мутации имеют умственную отсталость различной степени выраженности. Различия клинических проявлений у женщин может быть обусловлено феноменом несбалансированной лайонизации

Таблица 22.2. **Риск рождения ребенка с СМБ в зависимости от уровня экспансии тринуклеотидных повторов в гене *FMR1***

Количество CGG-повторов у матери	Риск рождения больного сына	Риск рождения больной дочери
56–59	7%	3,5%
60–69	10%	5%
70–79	29%	15%
80–89	36%	18%
90–99	47%	24%
Более 100	50%	25%

Х-хромосомы материнского и отцовского происхождения в различных клетках организма. Необходимо отметить еще одну особенность проявления этого заболевания. Показано, что даже при наличии полной мутации в гене у 20% мужчин симптомы болезни отсутствуют.

Диагностика заболевания может осуществляться с использованием различных методов. До выяснения молекулярно-генетических основ данной патологии клинический диагноз СМБ подтверждали исключительно цитогенетическими методами. Было известно, что у большинства больных при культивировании клеток в среде с дефицитом фолатов на кареограмме выявляется феномен «ломкости» Х-хромосомы в 27 сегменте ее длинного плеча. В последние годы разработаны простые и дешевые молекулярно-генетические методы диагностики СМБ. Они основаны на анализе метилирования CpG-островков, прилежащих к *FRAXA*, *FRAXE* и *FRAXF* в избирательной полимеразной цепной реакции. В ряде случаев для одновременного анализа состояния метилирования CpG-островков и экспансии повторов образцы ДНК больного обрабатывают рестриктазой *EcoR1*, а затем чувствительной к метилированию рестриктазой, один из участков узнавания которой расположен в промоторной области гена. С помощью этого метода удается диагностировать более 98% больных, имеющих метилированные полные мутации в гене *FMR1*. Третий подход к диагностике СМБ иммунохимический: методами иммунохимии определяется уровень белкового продукта гена *FMR1* в тканях человека.

В настоящее время благодаря молекулярно-генетическим методам стала возможной эффективная профилактика повторных случаев заболевания в отягощенных семьях. Молекулярный анализ позволяет диагностировать СМБ не только при наличии клинических проявлений заболеваний, но и выявлять носителей «премутации» среди родственников больных.

22.5. ПРИОННЫЕ БОЛЕЗНИ (ПБ)

В последние годы обнаружена группа заболеваний, характеризующихся прогрессирующим поражением различных отделов нервной системы и имеющих необычный генетический механизм возникновения и развития. На основании сходства морфо-

логического дефекта при этих заболеваниях их объединяют в группу спонгиофор ных энцефалопатий. Долгое время считалось, что клинические симптомы этих лезней возникают при попадании в организм инфекционного агента, имеющего тигенное сродство к нервным клеткам. Предполагалось, что в этом случае запуск ся механизм иммунного ответа, продолжающийся и после исчезновения из орган ма инфекционного агента, что приводит к образованию комплекса «антиген-анти ло» и гибели нейронов. Вскоре стало ясно, что основная патогенетическая ро развитии этих заболеваний принадлежит белковому агенту, который было предло но называть прионом (PRION – от англ. ***Proteinaceous Infectious particle***, с перестан кой двух букв). В настоящее время установлено, что заболевания этой группы име двоякую этиологию: первая группа болезней возникает в результате мутации в г прионного белка, вторая – обусловлена попаданием в организм человека инфици ванного биологического материала.

Наследственный характер установлен в 15–20% всех случаев прионных болез основной тип наследования – аутосомно-доминантный. Ген прионного бе (*PRNP*) картирован в коротком плече хромосомы 20, имеет протяженность в 16 т. и содержит 2 экзона. В настоящее время известно около 20 мутаций этого гена, п водящих к различным семейным формам прионных заболеваний. В ряде случае трансформации нормальной изоформы белка в аномальную приводит появление матической мутации в гене прионного белка в клетке-мишени.

Идентифицированы следующие типы мутаций: точковые мутации в кодирую области гена (миссенс и нонсенс) и инсерции дополнительных копий октапепт кодирующего повтора в проксимальной части гена (в норме в белке 5 повторов аминокислот, расположенных в аминоконцевом районе PrP). В результате этих таций вместо нормального клеточного белка PrP^c, транспортирующегося через ап рат Гольджи на поверхность клеточной мембраны нейрона, образуется его патоло ческая изоформа PrP^{Sc}, накапливающаяся в везикулах цитоплазмы (две послед буквы в аббревиатуре означают название наиболее распространенной прионной лезни человека и животных – скрепи (screpi)).

Нормальная и аномальные изоформы отличаются пространственной органи цией трехмерной структуры – в нормальном белке преобладают α-спиральные номеры (42%), а в аномальной изоформе – β-структуры (43%) в виде нерастворим фибриллоподобных агрегатов. Вследствие различий пространственной организа нормальная и аномальные формы прионов различаются по воздействию на них п теаз: так под действием протеазы К клеточный прионный белок полностью разру ется, а инфекционный – лишь частично до молекулярной массы 27–30 кДа (PrP 30) с сохранением патологических свойств (рис.22.12).

При второй группе прионных болезней появление клинических симптомов о словлено попаданием в организм патологической изоформы прионного белка с щей (при употреблении мяса зараженных животных и каннибализме) или в рез тате инъекционного введения инфицированного биологического материала (при мотрансфузиях, трансплантации органов и тканей, лечении препаратами, содер щими человеческие гормоны – соматотропин, гипофизарный гонадотропин, и

Для запуска патогенетического механизма прионных болезней достаточно по ления одной молекулы аномального прионного белка, которая, взаимодейству

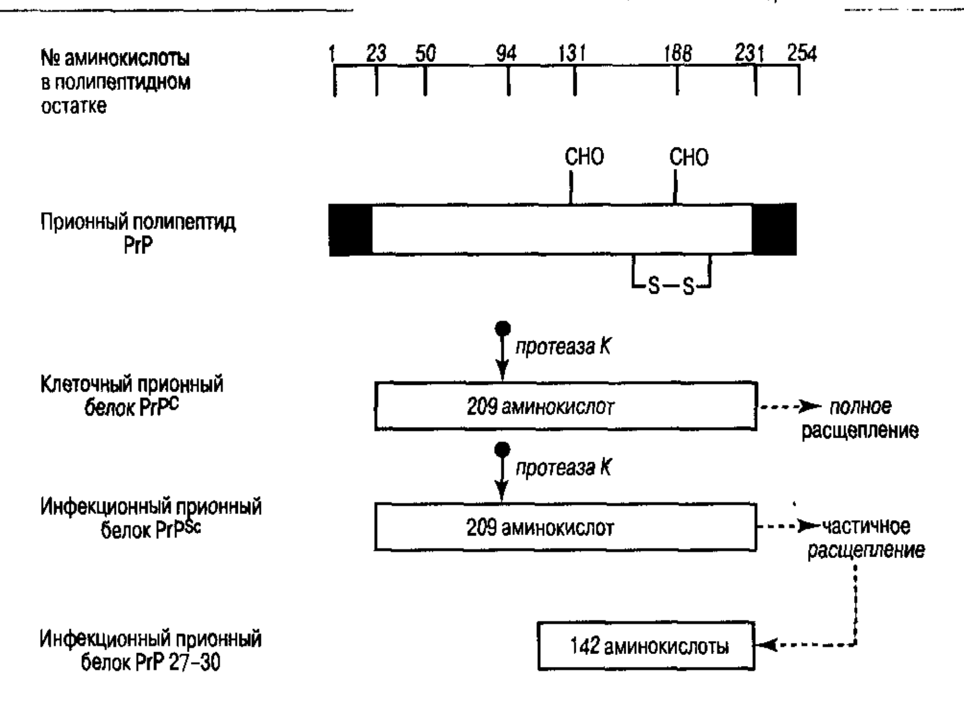


Рис. 22.12. Изоформы приона и их превращения

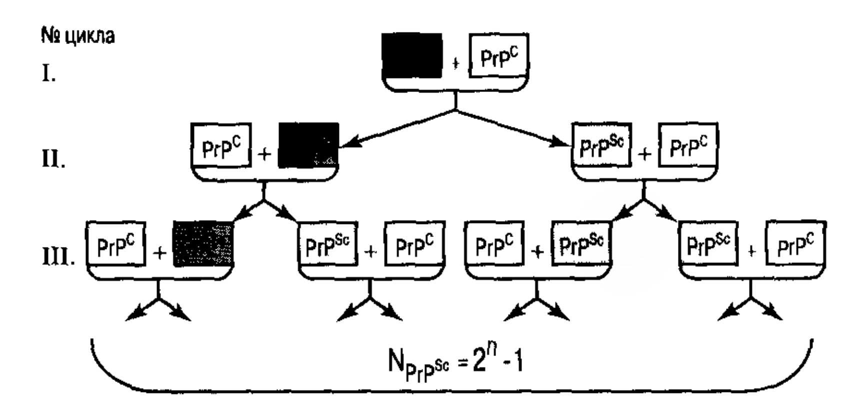
клеточной формой приона, изменяет ее конформационную структуру и приводит к экспоненциальному росту числа молекул PrP^{Sc} (рис. 22.13.).

Однако в патогенезе ряда форм прионных болезней центральная роль принадлежит другому белку — PrP27-30, ген которого в настоящее время не локализован. Показано, что нормальная форма этого белка присутствует в организме и разрушается под действем протеаз. Патологическая форма PrP27-30, устойчивая к воздействию протеолитических ферментов, обнаружена в специфических структурах пораженных клеток – прионных палочках, морфологически и гистохимически неотличимых от многих амилоидных структур.

Накопление белков PrP^{Sc} и PrP27-30 с последующим их транспортом в синаптические структуры приводит к дезорганизации синапсов и появлению выраженных неврологических дефектов и деменции.

Основные наследственные прионные болезни человека — болезни Крейтцфельда–Якоба, Герстманна–Штреусслера–Шейнкера и фатальная семейная инсомния. Показано, что эти заболевания являются аллельными генетическими вариантами и обусловлены миссенс-мутациями в одном и том же гене.

Клинические проявления ПБ разнообразны. Для наследственных вариантов ПБ характерно позднее начало (в возрастном интервале от 45 до 75 лет) и быстро прогрессирующее течение, приводящее к смерти больных спустя 6 месяцев — 5 лет от момента появления первых симптомов. Основные клинические симптомы — прогрес-



PrP^C – нормальный (клеточный) прионный белок

PrP^{Sc} – аномальный прионный белок (инфекционного происхождения или вследствие *мутации в гене PRNP*)

PrP^{Sc} – первая молекула, запускающая цепную реакцию

PrP^{Sc} – *молекулы, образующиеся в результате взаимодействия* PrP^{Sc} *с* PrP^C

n – количество циклов взаимодействия PrP^{Sc} *и* PrP^C

N – количество молекул мутантного прионного белка (PrP^{Sc})*, образующихся за n циклов*

Рис. 22.13. Цепная реакция, приводящая к накоплению молекул инфекционного прионного белка в геометрической прогрессии и возникновению заболевания

сирующая деменция, атаксия, эпилептические приступы, снижение остроты зрения, парезы и параличи. Для фатальной инсомнии характерно также нарушение ритма сна и бодрствования, гипертермия, дезориентация больных в пространстве и времени.

глава 23

НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ ОБМЕНА

23.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И КЛАССИФИКАЦИЯ

Наследственные болезни обмена (НБО) – одна из наиболее многочисленных и хорошо изученных групп моногенных болезней человека. Клинические проявления большинства НБО обусловлены выпадением каталитической функции ферментов, участвующих в утилизации и транспорте субстратов или выполняющих роль клеточных рецепторов. В основе патогенеза этой группы заболеваний лежат нарушения определенных биохимических процессов, сопровождающиеся накоплением веществ, предшествующих ферментативному блоку, или дефицитом конечных продуктов реакции. Классификация НБО до настоящего времени окончательно не разработана. Наиболее часто используется рабочая классификация, выделяющая 11 групп заболеваний:

- НБО аминокислот – аминоацидопатии (альбинизм, фенилкетонурия, тирозинемия);
- НБО углеводов – глюкозурии (галактоземия, гликогенозы);
- НБО липидов
  плазматические липидозы (семейная гиперхолестеролемия)
  клеточные липидозы (сфинголипидозы, лейкодистрофии)
- НБО стероидных гормонов (адреногенитальный синдром);
- НБО пуринов и пиримидинов (синдром Криглера–Найяра);
- НБО эритрона (гемолитические анемии);
- НБО металлов (болезнь Вильсона–Коновалова);
- лизосомные болезни (мукополисахаридозы);
- пероксисомные болезни (синдром Цельвегера);
- НБО соединительной ткани, мышц, костей;
- митохондриальные болезни.

Для НБО характерен чрезвычайно выраженный полиморфизм клинических проявлений, что объясняется различиями в патохимических нарушениях, возникающих в различных классах этой группы заболеваний. С другой стороны, выделяется множество нозологических форм НБО, сходных по клиническим проявлениям, но различающихся по ферментативному дефекту. Наличие таких заболеваний объясняется как функционированием различных ферментов в одной и той же цепи обменных превращений субстрата, так и участием одного и того же фермента в нескольких

биохимических реакциях. Несмотря на это, можно выделить некоторые общие клинические признаки, позволяющие заподозрить у больного расстройство метаболизма. Основные признаки НБО следующие:

- задержка психомоторного развития, возникающая с рождения или после периода нормального раннего развития ребенка;
- судорожный синдром;
- миопатии;
- повторные коматозные состояния;
- пароксизмы кетоацидоза;
- увеличение размеров печени и селезенки;
- атетозы, атаксия;
- синдром нарушенного кишечного всасывания (мальабсорбция);
- аномалии скелета;
- изменение цвета волос и кожи;
- катаракта;
- специфический запах мочи (потных ног, мышиный, кленового сиропа и др.)
- синдром внезапной смерти.

Безусловно, для каждой из выделенных групп НБО характерны свои специфические симптомы, обусловленные особенностями нарушения метаболических путей. В этой главе будут рассмотрены наиболее распространенные НБО.

23.2. НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ ОБМЕНА АМИНОКИСЛОТ (АМИНОАЦИДОПАТИИ)

Существует множество вариантов наследственных заболеваний, обусловленных нарушением обмена аминокислот в организме больного. Наиболее распространенные и хорошо изученные аминоацидопатии обусловлены дефектами метаболизма двух аминокислот – фенилаланина и тирозина. Фенилаланин – незаменимая аминокислота, которая не синтезируется в организме, а поступает с пищей. С помощью фенилаланингидроксилазы, экспрессирующейся в печени, фенилаланин превращается в тирозин. Дальнейшие превращения тирозина проходят несколькими путями. Первый путь контролируется тирозингидроксилазой. Под действием этого фермента из тирозина образуется диоксифенилаланин (ДОФА). Дальнейшие превращения ДОФА приводят к образованию меланина и медиаторов симпатического отдела центральной нервной системы. Недостаточная активность ферментов, участвующих в метаболизме фенилаланина и тирозина приводит к развитию нескольких наследственных заболеваний, наиболее распространенными из которых являются фенилкетонурия и альбинизм.

23.2.1. ГИПЕРФЕНИЛАЛАНИНЕМИИ (ГФА) (OMIM: 261600; 261640; 261630)

Гиперфенилаланинемии (ГФА) – группа генетически гетерогенных аутосомно-рецессивных заболеваний, обусловленных нарушением метаболизма незаменимой аминокислоты - фенилаланина. В основе патогенеза ГФА лежит накопление в крови фенилаланина и продуктов запасного пути его утилизации: фенилпировиноградной, фенилмолочной и фенилуксусной кислот, оказывающих токсический эффект на различные органы и ткани. В наибольшей степени страдают структуры центральной нервной системы.

В норме в организме человека основное количество фенилаланина утилизируется путем превращения его в тирозин, который в свою очередь служит субстратом для синтеза биогенных аминов и меланина (рис. 23.1.). Лишь небольшое количество фенилаланина используется для синтеза белка. Превращение L-фенилаланина в L-тирозин осуществляется с помощью фермента фенилаланингидроксилазы (ФАГ), которая представляет собой печеночную оксигеназу со смешанной функцией. Фетальный фермент состоит из двух белковых субъединиц (одна – лабильная, другая – стабильная, содержащая птеридин в качестве кофактора), а взрослый из

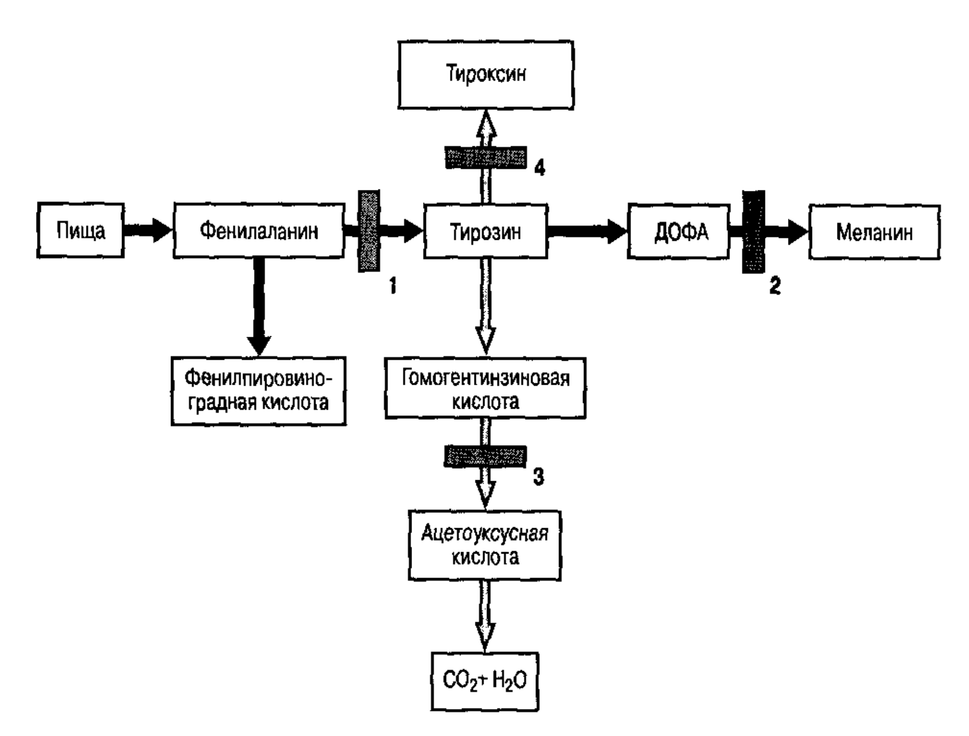


Рис. 23.1. Биохимические превращения фенилаланина и тирозина и основные метаболические блоки на их пути. (Из: R.F. Mueller, I.D. Young, 2001)

1. Фенилкетонурия; 2. Альбинизм, 3. Алкаптонурия; 4. Врожденный гипотиреоз

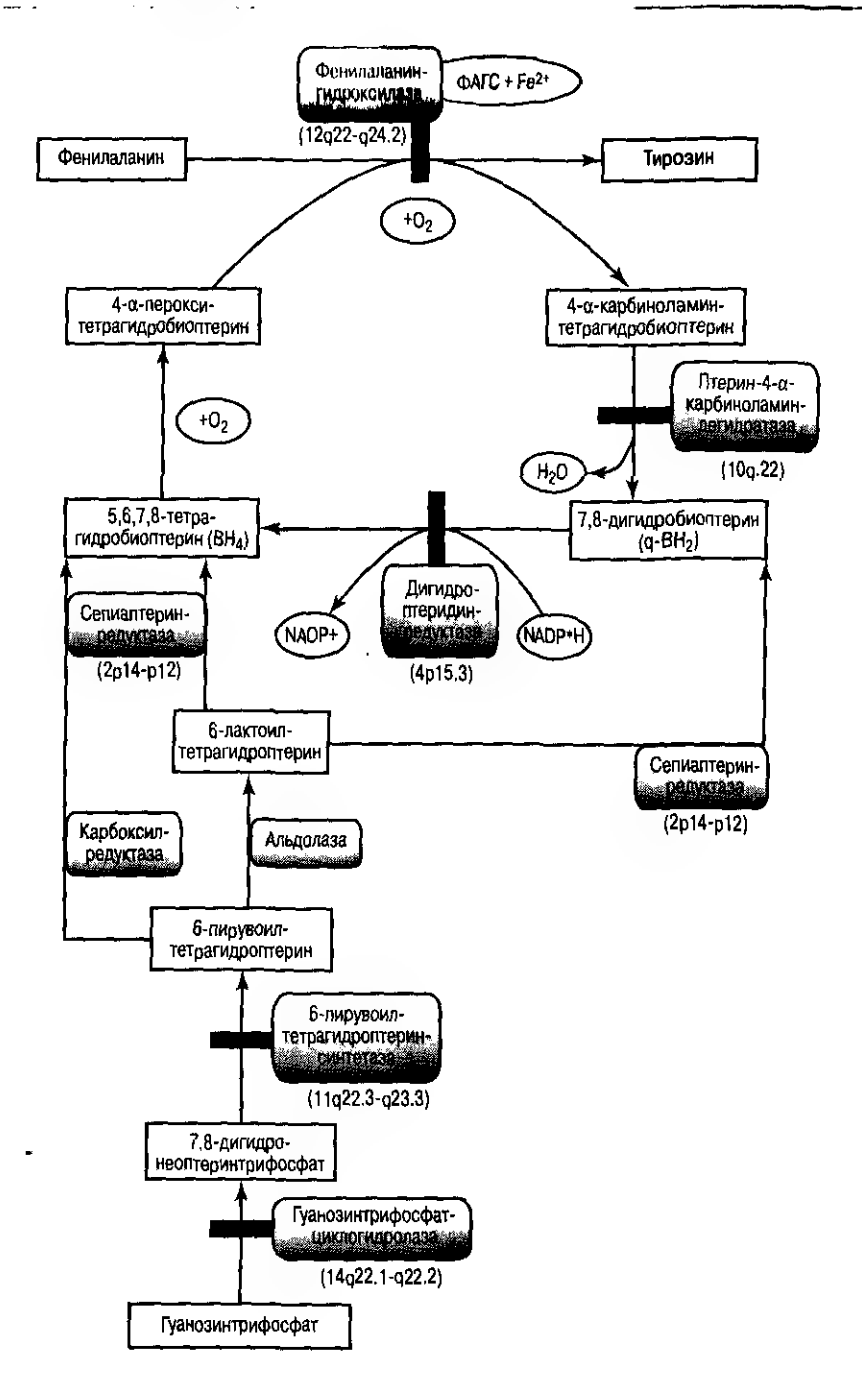


Рис. 23.2. Метаболические блоки на биохимических путях преобразования фенилаланина и его кофакторов, приводящие к ГФА

ФАГС – белок, стабилизирующий фенилаланингидроксилазу

ех белковых субъединиц (мол. масса 52кД). Активизация фермента происходит в присутствии ФАГ-стимулирующего белка (ФАГС). Наиболее частые типы мутаций гене ФАГ – однонуклеотидные замены и точковые делеции, вследствие которых происходит изменение вторичной структуры лабильного компонента фермента. Активность ФАГ зависит от трех основных кофакторов (рис. 23.2.): ФАГС, тетрагидробиоптерина (BH_4), молекулярного кислорода. Наибольшее значение из них имеет тетрагидробиоптерин. Функция этого кофактора заключается в доставке O_2 к активному центру ФАГ, в котором происходит реакция гидроксилирования фенилаланина. Иными словами, тетрагидробиоптерин служит восстановителем для молекулярного O_2 в процессах встраивания его в ряд субстратов (фенилаланин, тирозин, триптофан). Биоптерин-зависимыми монооксигеназами также являются тирозиновая и триптофановая гидроксилазы. Реакции, в которых биоптерин играет роль кофактора, представлены на рисунке 23.3. В процессе этих реакций кофактор переходит в дигидроформу – дигидробиоптерин-хинон.

Наличие метаболических блоков, препятствующих гидроксилированию фенилаланина в тирозин приводит к накоплению фенилаланина. Основными причинами, приводящими к гиперфенилаланинемическим состояниям, являются мутации в генах, кодирующих: 1) ФАГ, 2) ферменты, отвечающие за синтез биоптерина (гуанозинтрифосфатциклогидролаза, 6-пирувоилтетрагидроптерин–синтетаза) и 3) его дальнейшие превращения (дигидроптеридинредуктаза, птерин-4α-карбиноламин-дегидратаза; см. рис. 23.2). Согласно некоторым данным обратные превраще-

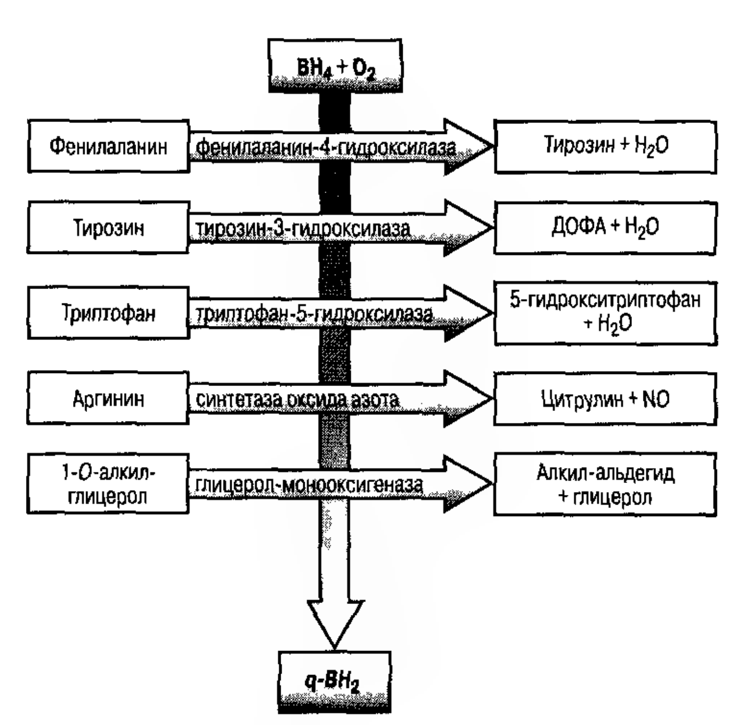


Рис. 23.3. Ферментативные реакции с участием биоптерина в качестве кофактора

Таблица 23.1. Характеристика основных ферментов, участвующих в патогенезе ГФА

Фермент	Локализация гена	Кол-во экзонов/Кол-во аминокислот	Заболевание	Степень тяжести	Лечение	Символ гена
фенилаланин-гидроксилаза	12q22-q24.2	13/452	ФКУ (классическая)	–	диета	*PAH*
гуанозинтри-фосфатцикло-гидролаза	14q22.1-q22.2	6/250	ЗГФА[1]	тяжелая	NT + BH_4	*GCH I*
птерин-4α-карбиноламин-дегидратаза	10q22	4/103	ГФА	транзи-торная	BH_4*	*PCBD*
6-пирувоил-тетрагидро-биоптерин-синтетаза	11q22.3-q23.3	6/145	ЗГФА	тяжелая	NT + BH_4	*PTS*
6-пирувоил-тетрагидро-биоптерин-синтетаза	11q22.3-q23.3	6/145	ЗГФА	средне-тяжелая	BH_4	*PTS*
6-пирувоил-тетрагидро-биоптерин-синтетаза	11q22.3-q23.3	6/145	ЗГФА	транзи-торная	BH_4*	*PTS*
дигидропте-ридинредук-таза	4p15.3	7/244	ЗГФА	тяжелая	NT + диета + фолиевая кислота	*QDPR*
дигидропте-ридинредук-таза	4p15.3	7/244	ЗГФА	средне-тяжелая	диета	*QDPR*

[1] ЗГФА ГФА с тяжелым злокачественным течением

ния кофактора (в нормальную форму) не имеют фатальных последствий для нормального метаболизма фенилаланина.

Таким образом, ГФА можно разделить на группы с учетом биохимических нарушений.

1. *ФАГ-зависимые ГФА (с пониженной активностью фенилаланингидроксилазы)*:

а) с резко сниженной активностью ФАГ – классическая ФКУ,

б) с умеренно сниженной активностью – атипичная ФКУ.

2. *ФАГ-независимые ГФА (с нормальной активностью фенилаланингидроксилазы)*:

а) биоптерин-зависимые ГФА (ГФА, обусловленные нарушением синтеза биоптерина; ГФА, обусловленные нарушением метаболизма биоптерина);

б) другие ГФА (без клинических проявлений; тяжелые формы ГФА, не связанные с известными биохимическими дефектами).

3. *Транзиторные формы ГФА.*

Молекулярно-генетические характеристики ГФА представлены в табл. 23.1.

Основное число случаев ГФА представлено ФАГ-зависимыми вариантами, которые составляют 98% ГФА.

23.2.1.1. ФЕНИЛКЕТОНУРИЯ

Фенилкетонурия (фенилаланинкетонурия, фенилпировиноградная олигофрения, ФКУ) – заболевание, обусловленное недостаточной (отсутствием или снижением) активностью фенилаланингидроксилазы. Первое описание этого заболевания принадлежит Фёллингу, который в 1934 г. обнаружил, что моча двух сибсов с умственной отсталостью при добавлении к ней треххлорного железа окрашивается в зеленый цвет. Кроме того Фёллинг доказал наследственный характер заболевания. Впоследствии Пенроуз установил аутосомно-рецессивный характер заболевания. Средняя частота ФКУ составляет 1:10000 новорожденных, а наибольшая распространенность характерна для популяций Ирландии и Шотландии, где ее частота достигает 1:4500 новорожденных, а также Турции – 1:2600. В нашей стране распространенность ФКУ не превышает 1: 10000 новорожденных.

Ген, кодирующий ФАГ, локализован в длинном плече 12-й хромосомы (12q22-q24.2). Основной тип мутаций в гене, обозначаемом *PAH*, – это однонуклеотидные замены, которые в большинстве случаев локализованы в 7, 9 и 12 экзонах. Показано, что в различных странах Европы и Азии встречается определенный спектр мутаций, одна из которых – мажорная. В России и странах Восточной Европы мажорной является однонуклеотидная замена в 12 экзоне, приводящая к замене аргинина на триптофан (R408W). С ней связаны 70% случаев. В Японии и Китае данная мутация не встречается. Эти данные свидетельствуют о том, что замена аргинин-триплета на триптофан-триплет произошла уже после разделения рас.

В основе патогенеза ФКУ – накопление фенилаланина и продуктов побочных реакций – фенилпировиноградной, фенилуксусной и фенилмолочной кислот, а также фенилэтиламина и фенилацетилглутамина, оказывающих токсическое действие на мозг и клетки внутренних органов больного. Ферментативный блок превращения фенилаланина в тирозин приводит также к уменьшению образования медиаторов центральной нервной системы (дофамина и диоксифенилаланина), что вносит вклад в развитие симптомов поражения ЦНС. Кроме этого наблюдается дефицит одного из конечных продуктов обмена фенилаланина – меланина, обусловливающий снижение пигментации кожи, волос, радужной оболочки глаз (дети голубоглазые и светловолосые, со светлой кожей).

Клиническая картина заболевания развивается уже спустя 2-3 недели после рождения. Первыми симптомами могут быть повышенная возбудимость, гиперрефлексия и мышечный гипертонус, тремор. Моча и пот таких больных имеют специфический запах, который иногда ассоциируют с «мышиным», из-за накопления фенил-

пировиноградной кислоты (ФПВК) и других метаболитов фенилаланина. Клинические проявления по мере накопления фенилаланина и его дериватов нарастают, и к шестимесячному возрасту у ребенка формируются необратимые изменения ЦНС и других органов и систем (дети с ФКУ склонны к дерматитам). Для больных ФКУ характерна прогрессирующая умственная отсталость, эписиндром (причем у 40% больных наблюдаются эпиприступы, а у 85–90% больных регистрируют на ЭЭГ эпилептическую активность) и другие психоневрологические расстройства. В тяжелых случаях моторное развитие практически отсутствует.

Причиной атипичной ФКУ или ФКУ с легким течением может быть гетерозиготность по мутациям, полученным больным ребенком от родителей, так как для обеспечения нормального физического и умственного развития без элиминационной диеты достаточна ФАГ с 10%-ой активностью от нормы.

23.2.1.2. ФАГ-НЕЗАВИСИМЫЕ ГФА

Эти формы ГФА встречаются достаточно редко и отличаются от ФКУ отсутствием эффекта от диеты с ограничением фенилаланина. Тяжесть клинической картины может варьировать в зависимости от их биохимического дефекта.

Лучше всего изучены биоптерин-зависимые ГФА. Эта подгруппа отличается более широким спектром клинических проявлений, преимущественно неврологической симптоматики, что связано с нарушением функции целого ряда ферментов, для которых биоптерин играет роль кофактора (см. рис. 23.3), а также, вследствие этого, и более злокачественным течением. Наиболее распространенными из биоптерин-зависимых ГФА являются две формы.

Одну из них, наиболее тяжелую, впервые описал Ауэрбах в 1967 году. Ее возникновение связано с недостаточностью дигидроптеридинредуктазы, осуществляющей восстановление активной формы тетрагидробиоптерина (см. рис. 23.2.). Ген этого фермента локализован на хромосоме 4p15.3. Частота заболевания не превышает 1:100 000 новорожденных. Без лечения больные погибают в раннем возрасте.

Другая форма биоптеринзависимой ГФА более мягкая и обусловлена недостаточностью 6-пирувоилтетрагидроптерин-синтетазы, которая обеспечивает образование тетрагидробиоптерина из дигидроптеринтрифосфата (см. рис. 23.2.). Заболевание встречается с частотой 1:30 000 новорожденных. Тяжесть клинической картины может варьировать от легких до тяжелых форм.

23.2.1.3. ТРАНЗИТОРНЫЕ ФОРМЫ ГФА

Транзиторные формы ГФА в большинстве случаев обусловлены незрелостью ферментативных систем новорожденного, например, при глубокой недоношенности или функциональной незрелости. К временному увеличению фенилаланина в сыворотке крови могут приводить тирозинемические состояния, которые наиболее распространены в Северной Америке. Так в штате Массачусетс (США) среди местного населения нередки случаи транзиторной тирозинемии у новорожденных. Провоци-

рующими факторами развития этого состояния у младенца являются преждевременные роды (вследствие чего не успевает повыситься активность парагидроксифенилпируватоксидазы) и чрезмерное употребление белковой пищи матерью. В результате наблюдается повышенная продукция субстрата, ингибирующего собственный фермент, вследствие чего уровень тирозина и фенилаланина в крови увеличивается до патологических значений. Впоследствии биохимические показатели нормализуются. Клинические проявления либо отсутствуют, либо очень незначительны. Однако, необходимо дифференцировать транзиторную тирозинемию от тирозиноза, характерного для франкоязычного населения Канады.

23.2.1.4. ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ГФА

Все формы ГФА можно диагностировать уже в первые недели или даже дни жизни ребенка, когда клинические проявления еще отсутствуют. Для этого проводят биохимический скрининг новорожденных на наличие гиперфенилаланинемии. При выявлении повышенной концентрации фенилаланина в крови ребенка необходимо продолжать обследование для уточнения нозологической формы ГФА: провести фенилаланин-нагрузочный тест и исследовать активность ФАГ. Повышенная концентрация тирозина в нагрузочном тесте свидетельствует о доброкачественном или транзиторном характере ГФА. Необходимо учитывать, что при определении активности ФАГ в половине случаев классической ФКУ обнаруживается остаточная активность ФАГ, составляющая до 6% от нормы, что связано с изменением вторичной структуры фермента вследствие однонуклеотидных замен и точковых делеций в гене. При биоптерин-зависимых ГФА активность этого фермента не изменена и для диагностики имеет значение изменение концентрации птеринов в моче и снижение активности ДГПР в фибробластах. В последнее время для многих форм ГФА стали возможными молекулярно-генетическая диагностика и выявление гетерозигот.

Фенилкетонурию можно диагностировать прямыми и косвенными ДНК-методами. Прямая диагностика направлена в основном на поиск наиболее частой мутации — R408W, которая выявляется методом ПЦР с последующей рестрикцией *Sty I*.

Косвенная диагностика предполагает использование полиморфного локуса Msp1, расположенного в 8-ом экзоне. Методика включает ПЦР и последующую рестрикцию.

Симптоматическое лечение больных любой формой ГФА неэффективно, в связи с чем, основной метод лечения — диетотерапия. Выбор тактики лечения детей с ГФА зависит от первичного биохимического нарушения. Для каждой формы существуют свои особенности диетотерапии (см. табл. 23.1.). Однако необходимо учитывать, что при классической ФКУ диета оказывается высокоэффективной лишь в том случае, если лечение начато не позднее 2–3 месячного возраста; а при тяжелых формах ГФА роль играют недели и дни.

При тяжелых формах ГФА необходима комбинированная терапия кофактором и биогенными аминами.

При классической форме ФКУ диетотерапия предполагает ограничение поступления в организм фенилаланина с пищей до минимальной возрастной нормы

(0,3–0,5 г/сут), т.е. количества необходимого для синтеза белков. Как известно, полное отсутствие фенилаланина приводит к резкому снижению веса, распаду тканей и общей аминоацидурии. В качестве основного продукта питания больным детям дают белковые гидролизаты (лофелак, кетонил, минафен, берлофен, нофелан), содержащие минимальное количество фенилаланина и включающие все другие незаменимые аминокислоты. Наиболее строгая диета необходима до 5-летнего возраста, далее позволяется постепенное расширение пищевого рациона. Отсутствие клинических признаков после прекращения диеты в старшем школьном возрасте обусловлено толерантностью сформировавшегося мозга к аномально высоким концентрациям метаболитов фенилаланина. Таким образом, ФКУ является одним из немногих наследственных моногенных заболеваний, при котором удалось разработать эффективное лечение, полностью предотвращающее развитие патологических симптомов.

Однако успешное лечение больных ФКУ породило ряд проблем. Во-первых, отсутствие отбора против гомозигот может привести к увеличению носителей гена в популяции. Во-вторых, у женщин, излеченных от ФКУ диетой, часто рождаются дети с умственной отсталостью и различными аномалиями развития, что связано с токсическим действием повышенных концентраций фенилаланина в крови женщины на плод. В связи с этим, в настоящее время всем беременным и планирующим беременность женщинам, гомозиготным по гену *PAH*, рекомендовано назначать диету, обедненную фенилаланином еще до наступления беременности и соблюдать ее в течение всего срока.

23.2.2. АЛЬБИНИЗМ

Альбинизм – группа наследственных болезней, клинические проявления которых обусловлены отсутствием или уменьшением количества красящего вещества меланина в коже, волосах и структурах глаза больного. Таким образом, заболевание относится к группе болезней обмена, патогенез которых обусловлен дефицитом конечного продукта метаболизма фенилаланина и тирозина. Меланин продуцируется субпопуляцией клеток, называемых меланоцитами. В пути биосинтеза меланина в меланосомах действуют три основных фермента: тирозин-гидроксилаза (тирозиназа), ДОФА-хромтаутомераза (тирозиназа-связанный протеин второго типа – TRP 2), ДГИКК-оксидаза (тирозиназа-связанный протеин первого типа – TRP 1). Важную роль в обмене меланина играет и интегральный мембранный белок, осуществляющий транспорт тирозина и ионов через мембрану меланосом (Р-белок) (рис. 23.4.). Ключевым ферментом в процессе образования меланина является тирозиназа, обеспечивающая гидроксилирование тирозина в ДОФА. Дальнейшие превращения ДОФА идут двумя путями, что приводит к образованию двух типов меланина – *эумеланина*, дающего черное и коричневое окрашивание кожи и *феомеланина*, окрашивающего кожу в желтый и красный цвет. Важная роль в дифференцировке двух типов меланина принадлежит также нормальному функционированию рецептора меланоцитстимулирующего гормона, а также процессов транспорта субстратов меланогенеза через мембрану меланосом.

В зависимости от наличия или отсутствия тирозиназы в волосяных луковицах различают два основных типа альбинизма – тирозиназа-позитивный и тирозиназа-

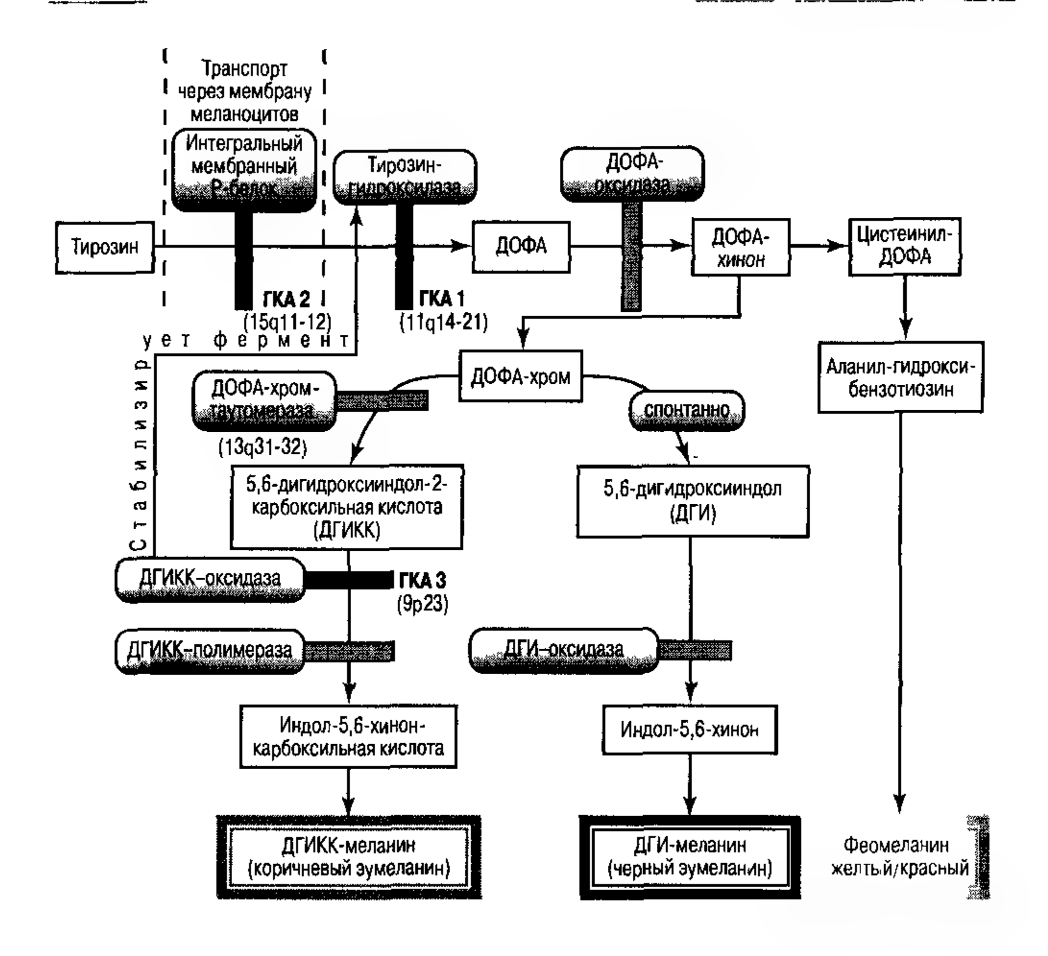


Рис. 23.4. Метаболические блоки на путях образования меланинов
ДОФА-хром-таутомераза – TRP2 (тирозиназа-связанный белок 2-го типа)
ДГИКК-оксидаза – TRP1 (тирозиназа-связанный белок 1-го типа)

негативный. Кроме этого, в зависимости от генерализации процесса выделяют глазо-кожный и глазной альбинизм. Описано три типа глазо-кожного альбинизма, возникающих при снижении активности трех основных ферментов, участвующих в меланогенезе.

23.2.2.1. ГЛАЗО-КОЖНЫЙ АЛЬБИНИЗМ 1-ГО ТИПА (ГКА1) (OMIM: 203100)

Заболевание встречается с частотой 1:20000 новорожденных и наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Возникновение этой формы альбинизма обусловлено му-

тациями в гене тирозиназы, картированном на хромосоме 11q14-q21. Описано достаточно большое число мутаций, основные из которых – однонуклеотидные замены. В зависимости от уровня активности фермента выделяют два подтипа ГКА – ГКА1А и ГКА1В. В первом варианте активность фермента близка к нулю, клинические проявления обнаруживаются с рождения и характеризуются отсутствием пигментации кожи и волос. Кожа и волосы ребенка – молочно-белого цвета, родинки отсутствуют, глаза голубые с просвечивающим глазным дном. Больные никогда не загорают. Характерны нистагм, резкое уменьшение или отсутствие пигментации сетчатки и гипоплазия зрительного тракта, что неизбежно приводит к снижению зрения больного. При втором варианте ГКА активность тирозиназы составляет 20–30% от нормы; клинические симптомы также проявляются с рождения, однако, пигментация волос и кожи присутствует, хотя и в ослабленном виде. Иногда волосы таких больных имеют специфический платиновый цвет (платиновый и желтый вариант альбинизма). По мере роста ребенка цвет волос и кожи может становиться более интенсивным, у ряда больных появляются родинки и способность загорать. Для этой формы ГКА также характерно снижение зрения и возникновение нистагма.

Некоторые типы мутаций в гене тирозиназы ассоциированы с симптомами, так называемого, температурочувствительного альбинизма. При этой форме заболевания отмечается разная интенсивность окраски волос на открытых и спрятанных под одеждой участках кожи. Так на голове и в подмышечных впадинах пигментация волос снижена или отсутствует, в то время как на разгибательных поверхностях рук и ног – волосы пигментированы. То есть синтез меланина происходит при воздействии низких температур и прекращается при их повышении.

23.2.2.2. ГЛАЗО-КОЖНЫЙ АЛЬБИНИЗМ 2-ГО ТИПА (ГКА 2) (OMIM: 203200)

Это тирозиназа-позитивный альбинизм, получивший наибольшее распространение у африканцев и афроамериканцев. Частота этого заболевания в ЮАР составляет 1:4000, а в Нигерии – 1:1100. Заболевание наследуется аутосомно-рецессивно и обусловлено мутациями в гене интегрального мембранного протеина Р, локализованного на хромосоме 15q11-q12 и содержащего 25 экзонов. Мажорной мутацией считают делецию 7-го экзона, на долю которой приходится около 60% всех случаев. Экспрессируемый геном белок локализован на мембране меланосом и осуществляет транспорт ионов и, возможно, тирозина через мембрану. Для этой формы альбинизма характерно снижение пигментации кожи и волос. С рождения волосы светлые с золотистым оттенком и их пигментация может увеличиваться с возрастом. Кожа больных, как правило, светлая, но в отдельных случаях может быть коричневой. По мере роста больного пигментация кожи может увеличиваться, вследствие чего появляются родинки, однако, больные не загорают. Для этой формы альбинизма также характерно снижение пигментации сетчатки и амблиопия.

23.2.2.3. ГЛАЗО-КОЖНЫЙ АЛЬБИНИЗМ 3-ГО ТИПА (ГКА 3) (OMIM: 203290)

Этот вариант альбинизма появляется при снижении концентрации тирозиназа-связанного белка 1-го типа, ген которого локализован на хромосоме 9p23. Основная функция этого белка заключается в стабилизации активности тирозиназы и обеспечении начального этапа синтеза ДГИКК-меланина (коричневого эумеланина). Заболевание встречается достаточно редко и его клинические проявления сходны с таковыми при ГКА 1-го типа, однако, менее выражены. В волосах и коже новорожденного ребенка присутствует меланин и его количество может увеличиваться с возрастом. Больные загорают и имеют пигментные невусы. Поражение глаз значительно менее выражено, чем при ГКА 1- и 2-го типа.

23.3. НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ ОБМЕНА УГЛЕВОДОВ

В эту группу заболеваний входит несколько нозологических форм, которые обусловлены снижением активности ферментов, участвующих в метаболизме моносахаров (глюкозы, фруктозы и галактозы), дисахаров (лактозы и сахарозы) и полисахаров (гликогена). Наиболее распространенные наследственные болезни углеводного обмена – галактоземия и гликогенозы.

23.3.1. ГАЛАКТОЗЕМИЯ (OMIM: 230400; 230200; 230350)

Это заболевание впервые описано А. Рессом в 1908 году. Его частота не превышает 1:15 000 новорожденных. Тип наследования – аутосомно-рецессивный. В настоящее время выделяют три генетических варианта, которые обусловлены недостаточностью основных ферментов, превращающих галактозу в клетках печени в глюкозу (рис. 23.5). На первом этапе метаболического пути галактоза, образованная в кишечнике из лактозы, фосфорилируется в печени под действием галактозо-1-фосфорилазы. Продукт этой реакции – галактоза-1-фосфат реагирует с уридиндифосфоглюкозой с образованием уридиндифосфогалактозы (UDP-галактоза) и глюкозо-1-фосфата. Эта реакция катализируется ферментом Г1ФУТ. Следующий этап превращения галактозы в глюкозу происходит под действием фермента галактоэпимеразы с участием NAD^+ в качестве кофермента, и приводит к образованию UDP-глюкозы. Практически все эти реакции обратимы и глюкоза может легко превращаться в галактозу, которая, таким образом, не является незаменимым пищевым компонентом.

Наиболее часто встречается галактоземия 1-го типа, обусловленная недостаточностью Г1ФУТ. Ген заболевания картирован на хромосоме 9p13. Основной тип му-

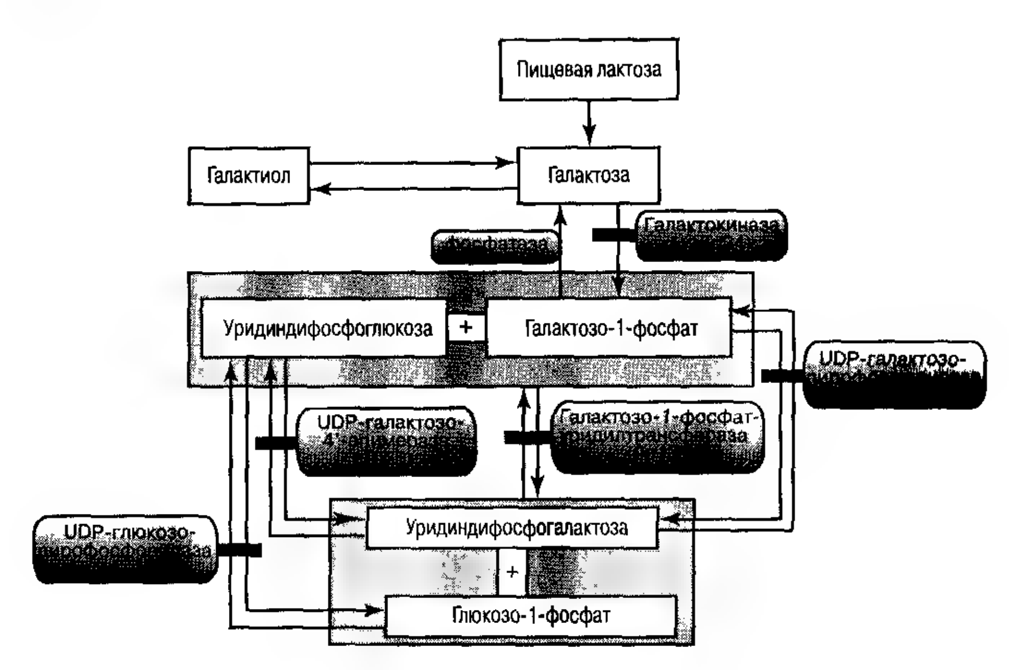


Рис. 23.5. Метаболические блоки превращений галактозы, приводящие к галактоземии

таций – однонуклеотидные замены. Мажорной мутацией является Gln188Arg. В основе патогенеза заболевания лежит токсическое действие на мозг, печень, кишечник и почки галактозы и галактозо-1-фосфата, накапливающихся в организме в результате метаболического блока. Токсическое действие заключается в ингибировании бактерицидной активности лейкоцитов, приводящем к развитию септических проявлений. При значительном накоплении галактозы она может метаболизироваться по побочному пути с образованием сахарного спирта – галактиола. Увеличение содержания этого вещества часто приводит к разрыву зонулярных волокон хрусталика и возникновению катаракт.

Клинические симптомы возникают через несколько дней после первого приема молочной пищи и характеризуются повторной рвотой, диареей и желтухой. В первые недели жизни ребенка формируется гепатомегалия и гемолитические проявления. По мере роста ребенка появляются отчетливые признаки задержки психомоторного развития, внутричерепной гипертензии, гипотрофии и почечной недостаточности. У большинства больных в первые месяцы жизни формируется катаракта. При несвоевременном лечении больные могут погибнуть от почечной или церебральной недостаточности.

Диагностику галактоземии можно проводить на доклинической стадии путем биохимического скрининга новорожденных. В более старшем возрасте диагноз ставится на основании:

1) типичных клинических проявлений;

2) повышения концентрации галактозы и галактозо-1-фосфата в плазме и моче и недостаточности Г1ФУТ в эритроцитах, лейкоцитах и фибробластах;

3) выявления мутации в гене Г1ФУТ.

Основной метод лечения галактоземии – безлактозная диета. Грудное молоко и молочные смеси заменяют на гидролизат казеина и соевое молоко. Необходимо отметить, что назначение безлактозной диеты не всегда приводит к полному исчезновению симптомов, как это происходит при фенилкетонурии, что связано с самоинтоксикацией больных галактозой, образующейся в организме из глюкозы.

Выявление заболевания возможно на дородовой стадии. Для этого исследуют активность фермента Г1ФУТ в культуре клеток плода и определяют наличие галактиола в амниотической жидкости. Возможна и прямая диагностика – выявление мутации в гене этого фермента при ДНК-анализе.

23.3.2. ГЛИКОГЕНОЗЫ

Гликогенозы - группа наследственных заболеваний, обусловленных недостаточностью ферментов, которые участвуют в синтезе и распаде гликогена. Этот полисахарид представляет собой гомополимер, имеет древовидную структуру и является основным депо глюкозы в печени и мышцах. Биосинтез гликогена происходит под действием нескольких ферментов, основные из которых: гексокиназа мышц и глюкокиназа печени, фосфоглюкомутаза и UDP-глюкозо-1-фосфат-уридилтрансфераза (рис. 23.6.). Наиболее важными ферментами деградации гликогена являются: гликоген-фосфорилаза (обладающая тканеспецифичностью) и деветвящие ферменты: олиго-1,4-1,4-глюкантрансфераза и амило-1,6-глюкозидаза. Под действием гликоген-фосфорилазы происходит расщепление 1-4 гликозидных связей, с образованием глюкозо-1-фосфата. Олиго-1,4-1,4-глюкантрансфераза обеспечивает перенос трисахаридного фрагмента с одной цепи на другую, а амило-1,6-глюкозидаза осуществляет гидролитическое расщепление, полностью удаляющее ветвление цепей. Заключительный этап распада гликогена снова происходит под действием фосфорилазы. Совместное действие этих ферментов приводит к полному расщеплению гликогена. Снижение активности различных ферментов расщепления приводит к избыточному отложению в тканях гликогена нормальной или аномальной структуры.

К настоящему времени описано более 10 гликогенозов, но наиболее часто встречаются пять из них. В зависимости от преимущественного накопления гликогена выделяют печеночную, мышечную и генерализованную формы гликогеноза.

23.3.2.1. ГЛИКОГЕНОЗ 1-ГО ТИПА (БОЛЕЗНЬ ГИРКЕ) (OMIM: 232200)

Заболевание возникает в результате снижения активности фермента глюкозо-6-фосфатазы. Существует несколько генетических вариантов, наследующихся аутосомно-рецессивно.

Первый вариант возникает в результате мутации структурного гена глюкозо-6-фосфатазы эндоплазматического ретикулума, картированного на хромосоме 17q21. Второй вариант обусловлен мутациями в гене Ca^{2+}-связывающего полипептида,

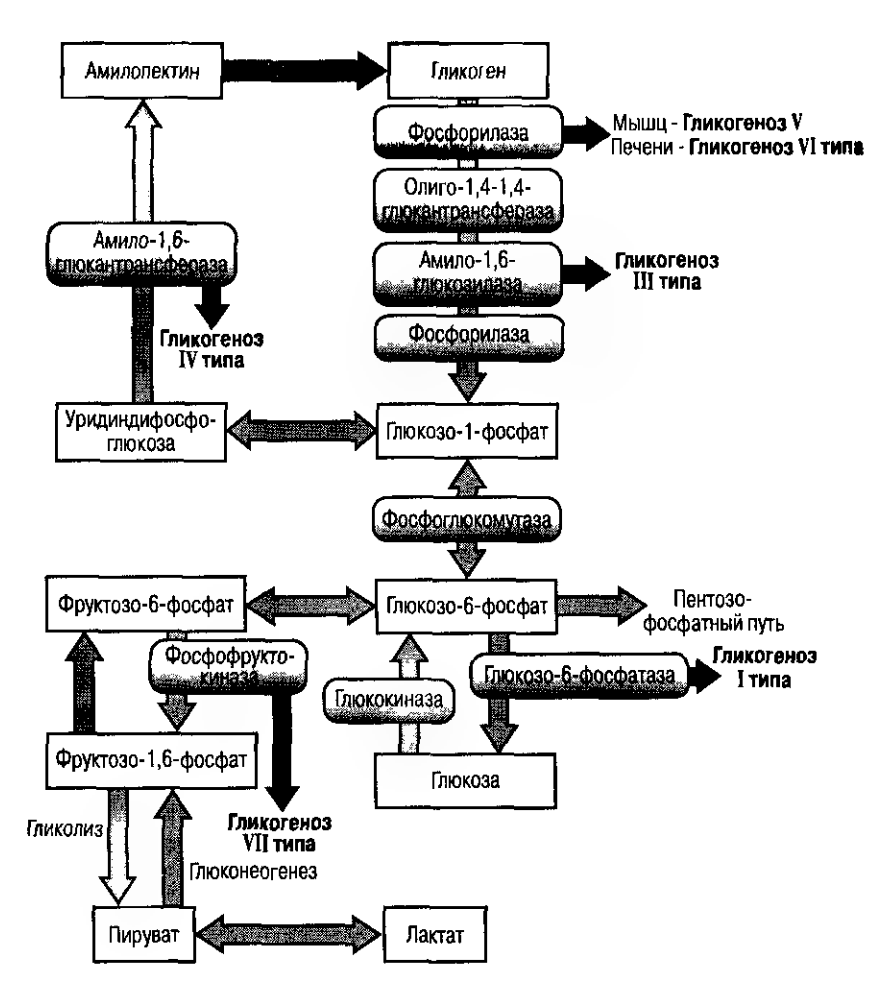


Рис. 23.6. Метаболические блоки, возникающие на путях синтеза и распада гликогена

стабилизирующего каталитическую активность глюкозо-6-фосфатазы эндоплазматического ретикулума. Локус гена не идентифицирован. Мутационное нарушение его структуры приводит к инактивации и недостаточности фермента. Третий вариант связан с мутациями структурного гена Т1-белка, обеспечивающего микросомный транспорт глюкозо-6-фосфата. Этот ген картирован на хромосоме 11q23. Снижение концентрации белка Т1 также приводит к недостаточности глюкозо-6-фосфатазы. Недостаточность фермента обусловливает гипогликемию даже при малейшем голодании (из-за блокады гликогенолиза и глюконеогенеза) и накопление гликогена в печени, почках и слизистой кишечника, что приводит к дисфункции этих органов. Накопление субстрата блокированной реакции, глюкозо-6-фосфата, в свою очередь, стимулирует гликолиз и накопление лактата. Стимуляция гликолиза ведет к увеличению синтеза глицерола и ацетил-СоА, субстратов и кофакторов синтеза триглицеридов в печени.

Клинические проявления варьируют. Первые признаки заболевания появляются на первом году жизни (чаще в 3–4 месяца) и характеризуются гипогликемией, лактат-ацидозом, гепатомегалией и гипогликемическими судорогами. Больные отстают в росте и имеют низкий вес. Наблюдаются локальные отложения жира, преимущественно на щеках («кукольное» лицо), груди, ягодицах, бедрах. Могут возникать ксантомы на локтях, коленях, ягодицах и бедрах. Гипогликемия, чаще бессимптомная, или с судорогами и тяжелым лактат-ацидозом, возникает при малейшем голодании и при отсутствии своевременного диагноза и лечения приводит к смерти в возрасте от 1-го года до 3-х лет. Метаболический ацидоз дает декомпенсацию и развивается респираторный дистресс-синдром при заболеваниях верхних дыхательных путей. Если больной переживает острые метаболические кризы младенческого возраста, течение заболевания становится хроническим. Прогрессирует нарушение функции почек, подагрический артрит, отставание в росте, задержка полового созревания, носовые кровотечения, остеопения, остеопороз, склонность к переломам и гепатомегалия с печеночной недостаточностью. У некоторых больных развивается легочная гипертензия и сердечная недостаточность, приводящая к смерти в юношеском возрасте.

При биохимическом исследовании выявляется лактат-ацидоз, гипогликемия. При биопсии печени отмечается недостаточность глюкозо-6-фосфатазы.

Целью лечения является поддержание нормального уровня глюкозы в крови. Показаны частые кормления в течение дня с ночными назогастральными вливаниями растворов глюкозы (8–10 мг/кг/мин у младенцев или 5–7 мг/кг/мин у детей старше 3 лет) или полный переход на парентеральное питание для купирования гипогликемии. Потребление фруктозы и галактозы должно быть ограничено, так как они не могут быть превращены в глюкозу. С возрастом гипогликемия становится менее выраженной. Как крайняя мера, при несостоятельности других методов терапии может использоваться пересадка печени и/или почек.

23.3.2.2. ГЛИКОГЕНОЗ 2-ГО ТИПА (БОЛЕЗНЬ ПОМПЕ) (OMIM: 232300)

Заболевание возникает в результате мутации в гене лизосомной кислой α-D-глюкозидазы, которая обеспечивает деградацию гликогена в лизосомах. Тип наследования заболевания – аутосомно-рецессивный. Ген картирован на хромосоме 17q23. Недостаточность фермента ведет к отложению негидролизованного гликогена в лизосомах мышц – сердечной и скелетных («пенистые» клетки – при морфологическом исследовании), что сопровождается картиной прогрессирующей мышечной дистрофии.

Клинические проявления варьируют. Различают раннюю инфантильную, позднюю инфантильную, ювенильную и взрослые формы с хроническим течением заболевания. Ранняя инфантильная форма возникает в первые месяцы жизни и характеризуется плаксивостью, снижением двигательной активности, генерализованной прогрессирующей мышечной слабостью, включая дыхательную мускулатуру. Наблюдается задержка психомоторного развития: ребенок не держит голову, не сидит, при пальпации может выявляться гипертрофия мышц. Выявляются трудности вскармливания за счет дисфагии, гипотрофия. Характерными признаками заболева-

ния являются макроглоссия, выраженная кардиомегалия и гепатомегалия. Смерть больных наступает в возрасте до 1 года от сердечной или сердечно-легочной недостаточности.

Поздняя инфантильная и ювенильная формы начинаются в младенчестве, в раннем и старшем детском возрасте – от 3 до 10 лет. Клинические проявления характеризуются прогрессирующей мышечной дистрофией и висцеромегалией (кардиомегалия, гепатомегалия, спленомегалия). Смерть наступает на втором десятилетии жизни от декомпенсированной сердечно-легочной недостаточности.

Взрослая форма манифестирует на 2–3 десятилетии жизни и проявляется симптомами дистальной миопатии, сколиозом грудного отдела, лордозом, медленно прогрессирующей сердечной недостаточностью. Больные доживают до старости.

23.3.2.3. ГЛИКОГЕНОЗ 3-ГО ТИПА (OMIM: 232400)

Заболевание связано с мутациями структурного гена цитозольной амило-1,6-глюкозидазы, экспрессирующейся во многих тканях: печени, мышцах, эритроцитах. Ген картирован на хромосоме 1р21. Как и предыдущие варианты, третий тип гликогеноза наследуется по аутосомно-рецессивному типу. В популяции евреев-сефардов (выходцев из Северной Африки) болезнь встречается с частотой 1:5400 новорожденных. Амило-1,6-глюкозидаза участвует в метаболизме гликогена в точках ветвления гликогенового «дерева». Фермент является бифункциональным: с одной стороны, превращает лимит-декстрин в гликоген с наружными цепями нормальной длины и, с другой стороны, освобождает глюкозу путем гидролиза α-1,6-глюкозидной связи. Недостаточность фермента приводит к нарушению гликогенолиза и накоплению в тканях молекул гликогена аномальной формы с укороченными наружными цепями. Также как и при гликогенозах I и 2 типов, при этом варианте заболевания нарушение гликогенолиза сопровождается гипогликемией, лактат-ацидозом, гиперкетонемией.

Клинические проявления варьируют. Различают две клинические формы с хроническим течением: IIIa – при которой возникают симптомы поражения печени и мышц и IIIb – при которой поражается только печень. Заболевание начинается в возрасте от 6 мес до 3-х лет. Клиническая картина в детском возрасте сходна с таковой при гликогенозе I типа. Характерные симптомы – гепатомегалия, отставание в росте, гипотрофия, «кукольное» лицо, локальные отложения жира, кожные ксантомы. Типичны лактат-ацидоз с гиперкетонемией при голодании. Гепатомегалия с дисфункцией печени, найденная у всех больных в детстве, имеет тенденцию исчезать в постпубертатный период. Больные обычно доживают до взрослого возраста, но возможен синдром внезапной смерти младенца. У взрослых больных доминирует миопатия с прогрессирующей мышечной слабостью при физической нагрузке (иногда в виде шаткой походки), гипотрофия мышц дистальных отделов нижних конечностей (преимущественно икроножных мышц), в более позднем возрасте присоединяется поражение мышц рук.

Диагностика заболевания проводится на основе клинической картины и данных лабораторного исследования: снижения активности амило-1,6-глюкозидазы и отложения гликогена измененной структуры в гепатоцитах и мышцах. В плазме крови

отмечается увеличение концентрации лактата, мочевой кислоты, холестерина и триглицеридов.

23.3.2.4. ГЛИКОГЕНОЗ 4-ГО ТИПА (БОЛЕЗНЬ АНДЕРСЕНА) (OMIM:232500)

Заболевание возникает в результате мутаций гена микросомной амило-1,4:1,6-глюкантрансферазы, приводящих к ее недостаточности в печени, мышцах, лейкоцитах, эритроцитах и фибробластах. Ген картирован на хромосоме 3p12. Тип наследования – аутосомно-рецессивный.

Амило-1,4:1,6-глюкантрансфераза участвует в синтезе гликогена в точках ветвления гликогенового «дерева». Фермент соединяет сегмент из, по-крайней мере, шести α-1,4-сцепленных глюкозидных остатков наружных цепей гликогена с гликогеновым «деревом» α-1,6-гликозидной связью. При недостаточности фермента в клетках печени и мышц откладывается амилопектин, что приводит к повреждению клеток. Концентрация гликогена в печени не превышает 5%.

Заболевание манифестирует на первом году жизни неспецифическими гастроинтестинальными симптомами: рвотой, диареей. По мере прогрессирования заболевания возникает гепатоспленомегалия, прогрессирующая печеночная недостаточность, генерализованная мышечная гипотония и атрофия, а также тяжелая кардиомиопатия. Смерть больных обычно наступает до 3–5 лет вследствие хронической печеночной недостаточности, редко – в старшем детском возрасте (до 8 лет).

Лабораторная диагностика основана на обнаружении гликогена с измененной структурой в биоптате печени и снижении активности амило-1,4:1,6-глюкантрансферазы.

23.3.2.5. ГЛИКОГЕНОЗ 5-ГО ТИПА (БОЛЕЗНЬ МАК-АРДЛЯ) (OMIM: 232600)

Это заболевание представляет собой мышечный вариант гликогеноза, при котором все патологические признаки отмечаются только в мышечной ткани. В основе патогенеза лежит снижение активности мышечной гликоген-фосфорилазы, которая составляет около 5% всех растворимых мышечных белков. Ген этого фермента локализован в области хромосомы 11q13. Основной тип мутаций – однонуклеотидные замены. Мажорной считают нонсенс-мутацию в 49 кодоне первого экзона. Тип наследования аутосомно-рецессивный.

Первые признаки заболевания возникают в детском или юношеском возрасте и характеризуются появлением болезненных мышечных спазмов после физических нагрузок, которые исчезают в период расслабления. Мышечные спазмы сопровождаются выраженным уплотнением мышц. Достаточно часто, во время тонических спазмов, могут наблюдаться выраженные вегетативные симптомы: усиление потоотделения, тахикардия, побледнение кожных покровов. По мере прогрессирования заболевания могут формироваться контрактуры крупных суставов.

Диагностика заболевания включает клиническое обследование, определение активности мышечной гликоген-фосфорилазы в биоптате мышечного волокна. Для подтверждения диагноза проводят молекулярно-генетический анализ с целью обнаружения мутаций в гене этого фермента.

23.4. НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ ОБМЕНА ЛИПИДОВ

Наследственные болезни обмена липидов — обширная группа заболеваний, возникающих в результате нарушения одной из стадий синтеза, транспорта и деградации липопротеинов, в состав которых входят все основные плазменные липиды — триглицериды (ТГ), фосфолипиды, холестерол (ХС) и свободные жирные кислоты. Липиды плазмы крови наиболее часто находятся в соединении с различными апопротеинами, образуя липопротеины. К настоящему времени лучше всего изучены 8 основных апопротеинов – Аро-А 1, 2, 4, Аро-В, Аро-С 1,2 ,3 и Аро-Е. Некоторые апопротеины являются составной частью определенных липопротеинов, другие же могут мигрировать от одного липопротеина к другому. Существует четыре основных класса липопротеинов плазмы крови:

1) хиломикроны (ХМ) – образуются в клетках слизистой оболочки кишечника и являются носителями пищевых ТГ;

2) липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП) – образуются в печени и используются для экспорта ТГ в другие ткани;

3) липопротеины низкой плотности (ЛПНП) – являются конечными продуктами катаболизма ЛПОНП и переносчиками ХС в клетки;

4) липопротеины высокой плотности (ЛПВП) – осуществляют метаболизм ХМ и ЛПОНП и транспортируют ХС из клеточных мембран в печень.

Типичный липопротеин состоит из липидного ядра, образованного триглицеридами и эфирами холестерола и наружного слоя, представленного фосфолипидами, холестеролом и апопротеинами (рис. 23.7.). Нормальный метаболизм липидов происходит следующим образом. Синтезированные в кишечнике ХМ и в печени ЛПОНП попадают в кровеносное русло и переносят ТГ в жировые клетки и другие ткани. После отделения ТГ в жировых клетках, ХМ вновь поступают в печень, а ЛПОНП превращаются в ЛПНП, обогащенные ХС и содержащие Аро-В и Аро-Е. ЛПНП сохраняются в кровеносном русле в течение 2,5 суток и служат транспортерами ХС в различные клетки. Поступление ХС в клетки осуществляется при помощи рецепторов ЛПНП, количество и функции которых находятся под генетическим контролем. Клеточные рецепторы группируются в специальных участках клеточной мембраны, погруженных виде кратера в цитоплазму. После взаимодействия рецептора с ЛПНП участок мембраны, содержащий рецепторы, втягивается внутрь клетки и образует окаймленную везикулу. В цитоплазме ЛПНП отделяются от рецептора и проникают в лизосомы, а рецепторы возвращаются на клеточную мембрану. Освобо

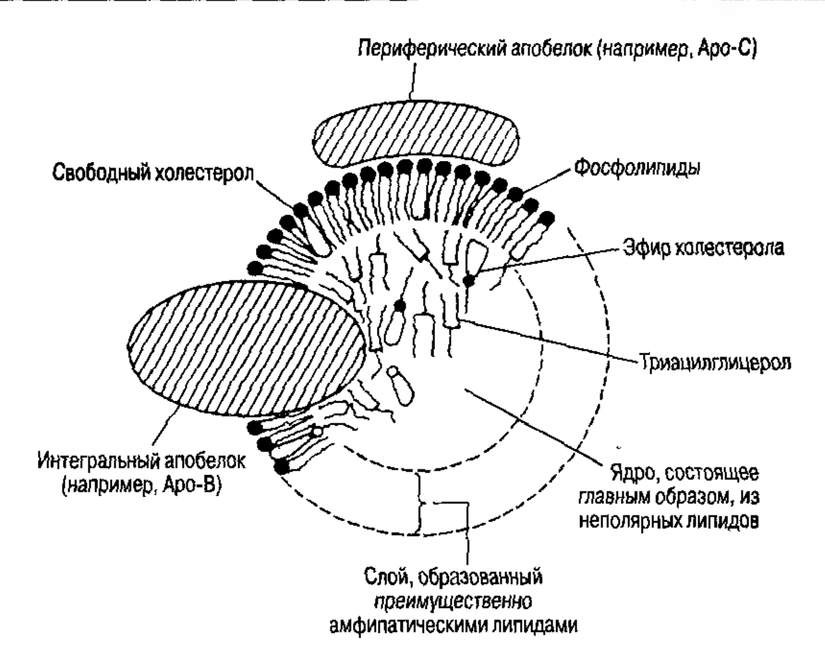


Рис. 23.7. Строение липопротеина. (Из: Р. Марри, Д. Гренер, П. Мейес, В. Родуэлл, 1993)

ждение ХС из ЛПНП осуществляется под действием нескольких ферментов. Обратная доставка ХС в клетки печени и тонкого кишечника осуществляется ЛПВП также с использованием механизма рецепторного эндоцитоза. Схема обменных превращений липопротеинов представлена на рис. 23.8.

Таблица 23.2. **Моногенные дефекты метаболизма липопротеинов, приводящие к гиперлипидемиям**

Группа метаболических нарушений	Локализация гена	OMIM
I. Дефицит апопротеинов:		
Аро-AI	1q23	107680
Аро-В	2p24-23	107730
Аро-С2	19q13.1	207750
Аро-С3	11q23	107720
Аро-Е	19q13.1	107741
II. Дефицит ферментов метаболизма:		
липопротеинлипазы	8p22	238600
печеночной триглицеридлипазы	15q21-23	151670
холестеролацилтрансферазы	16q22	245900
III. Дефект рецепторов к липопротеинам		
дефицит рецепторов ЛПНП	19p13.2-p13.1	143890
IV. Дефект транспортных белков липопротеинов:		
транспортный белок эфиров холестерола	16q21	118470
транспортный белок фосфолипидов	20q12-q13.1	172425
микросомальный транспортный белок триглицеридов	4q22-24	157147

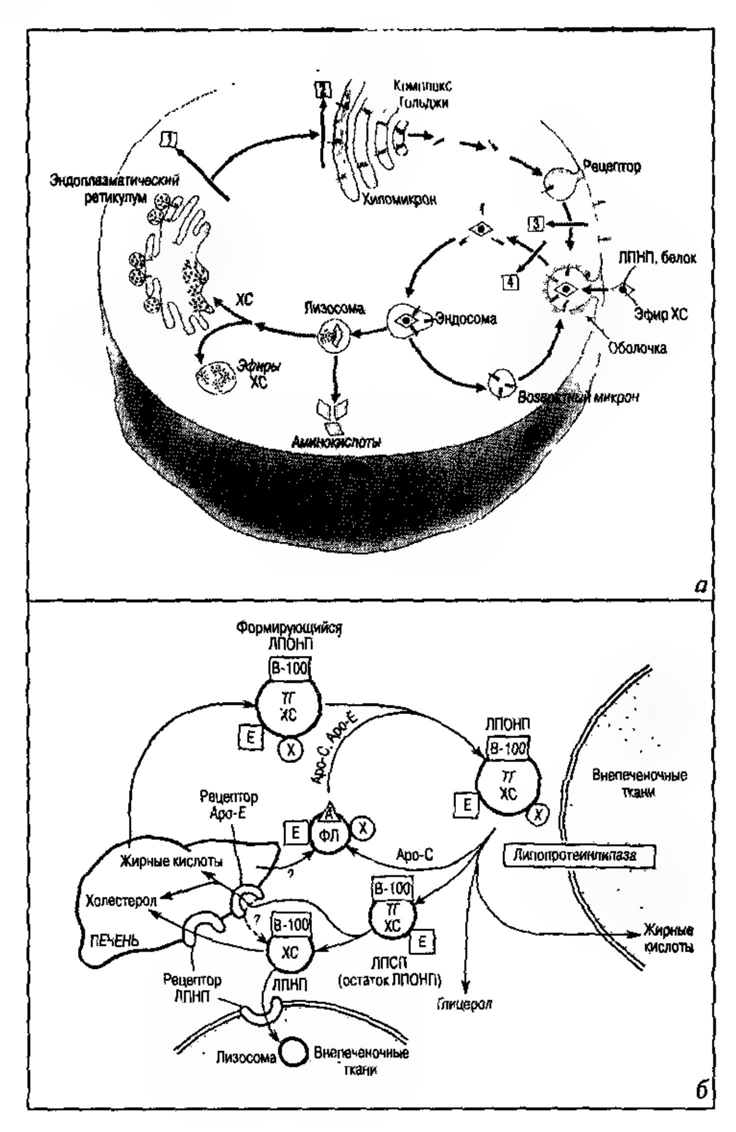


Рис. 23.8. Обменные превращения холестерола и липопротеинов низкой и очень низкой плотности.

а – эндоцитоз *ЛПНП и метаболизм* холестерола во внепеченочных тканях (Из: R F. Mueller, I.D. Young, 2001)

Метаболические блоки при семейных *гиперхолестеролемиях: 1) нарушение синтеза рецептора* ЛПНП; 2) нарушение транспорта *рецептора ЛПНП к комплексу* Гольджи; 3) нарушение связывающей функции рецептора ЛПНП; 4) нарушение пакующей способности рецептора ЛПНП;

б – формирование и обменные превращения липопротеинов очень низкой и низкой плотности (ЛПОНП и ЛПНП) в печени. (Из: Р Марри, Д. Гренер, П. Мейес, В. Родуэлл, 1993)

ХС – холестерол и его эфиры; *апобелки*. А, В, С, Е - Аро-А, Аро-В, Аро-С, Аро-Е, соответственно; *ЛПВП - липопротеины высокой плотности, ЛПСП - липопротеины средней плотности, ТГ* – триацилглицерол; ФЛ – фосфолипиды

Основные этапы обмена ХС в организме находятся под сложным генетическим контролем. Нарушение в результате мутаций различных этапов этого метаболического пути может привести к задержке выведения ХС из организма и возникновению различных вариантов гиперлипидемий, развитию атеросклероза сосудов сердца и мозга. В последние годы удалось расшифровать молекулярно-генетические механизмы некоторых моногенных болезней, обусловленных нарушением обмена липидов. Их основные характеристики представлены в табл. 23.2.

Рассмотрим более подробно одно из этих заболеваний.

23.4.1. СЕМЕЙНЫЕ ГИПЕРХОЛЕСТЕРОЛЕМИИ (СГ)

Это генетически гетерогенная группа заболеваний, как моногенной, так и мультифакториальной природы. Моногенные формы заболевания – результат мутаций в различных генах, участвующих в синтезе и утилизации липопротеинов. Наиболее часто мутация затрагивает ген рецептора ЛПНП. Это приводит к развитию СГ 2а-типа (OMIM:143890). Болезнь поражает как гетеро- , так и гомозигот по мутантному аллелю гена и наследуется по аутосомно-доминантному типу. Гетерозиготы встречаются с частотой 1:500 человек в различных популяциях мира, частота гомозигот значительно ниже и не превышает 1:1 млн. человек. Ген рецептора ЛПНП располагается на хромосоме 19p13.2-p13.1 и содержит 18 экзонов и 17 интронов. Кодируемый им рецептор относится к семейству гликопротеинов, состоит из 860 аминокислот и имеет доменную структуру. На рисунке 23.9. схематично показано расположение доменов рецептора ЛПНП и структура кодирующих их экзонов. Первый экзон кодирует участок полипептидной цепи, играющий роль сигнальной последовательности. Экзоны со 2 по 6 кодируют 292 аминокислоты, сгруппированных в 7 тандемно повторяющихся последовательностей и образующих лиганд-связывающий домен. Основная функция этого домена заключается в формировании ионных взаимодействий с Аро-В- и Аро-Е-белками. Экзоны 7 -14 кодируют аминокислотную последовательность, имеющую гомологию с предшественником эпидермального фактора роста (ПЭФР, EGF). Функции этого белкового участка окончательно не установлены. 15-й экзон кодирует образование 58 аминокислот, функции которых также не уточнены. Экзоны 16 и 17 образуют 22 гидрофобные аминокислоты, обеспечивающие заякоривание рецептора на клеточной мембране. 18-й экзон образует 50 аминокислот, содержащих две сигнальные последовательности, необходимые для правильной организации рецептора на мембране. К настоящему времени описано более 420 различных мутаций, которые в зависимости от воздействия на патогенез можно сгруппировать в 5 классов:

1) приводящие к прекращению синтеза рецептора;

2) нарушающие миграцию рецептора из эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи;

3) изменяющие процесс связывания рецептора с ЛПНП;

4) нарушающие кластеризацию рецептора на клеточной мембран;

5) нарушающие процесс отщепления ЛПНП в клетке и транспорт рецептора к мембране клетки.

СТРУКУРА (▬ участки богатые цистеином)	ДОМЕН	№ экзона	Функция
	Сигнальная последовательность	1	Образование мРНК
4, 3, 5, 2, 7, 6, H_2N, 1	Лиганд-связывающий	2 – 6	Связывание с апобелками транспорт
A, B, C	Гомолог EGF предшественника	7 – 14	Обратный транспорт рецептора на мембрану
	Гликозилированный (содержит О-концевые сахара)	15	Неизвестна
	Мембранный	16, 17	Фиксация на мембране
COOH	Цитоплазматический	17, 18	Ориентация рецептора на мембране

Рис. 23.9. Расположение доменов рецептора ЛПНП и их молекулярные характеристики

Мутации относящиеся к первому классу, возникают в промоторе гена или представляют собой нонсенс или сплайсинговые мутации вблизи его 5′-конца. Мутации второго типа наиболее часто затрагивают экзоны 7–14 и приводят к изменению нормальной укладки и пространственной ориентации белка. Третий тип мутаций нарушает функционирование лиганд-связывающего домена и/или аминокислотную последовательность, имеющую гомологию с ПЭФР. Мутации четвертого типа нарушают функционирование домена, обеспечивающего заякоривание белка на мембране

клеток (чаще всего это точковые мутации, обусловливающие замену цистина на тирозин). Мутации относящиеся к пятому классу, нарушают функционирование аминокислотной последовательности гомологичной ПЭФР. Они играют важную роль в отщеплении ЛПНП и высвобождении рецепторов внутри клетки. Существуют два региона гена, в которых мутации обнаруживаются наиболее часто – экзоны 4 и 6. Еще одна особенность мутаций в гене рецептора ЛПНП состоит в высокой частоте инсерций и делеций, возникающих в результате рекомбинации между внутригенными Alu-повторами.

Патогенез семейной гиперхолестеролемии в настоящее время представляется следующим образом. При недостаточности рецепторов ЛПНП на клеточной мембране и нарушении их функционирования увеличивается концентрация ЛПНП в кровяном русле. Их длительная циркуляция в крови приводит к образованию макрофагоподобных клеток (клеток-«чистильщиков»), которые начинают захватывать химически измененные ЛПНП. Считают, что клетки-«чистильщики» возникают из интимы артерий и стволовых клеток и могут быть основой атеросклеротических бляшек сосудов.

Второй генетический вариант СГ наследуется мультифакториально и может возникать у лиц, не имеющих мутаций в гене рецептора ЛПНП. В этом случае вклад в генетическую предрасположенность к развитию заболевания вносят мутации в различных генах, участвующих в синтезе холестерола или являющихся транскрипционными факторами. В качестве средовых факторов, провоцирующих развитие болезни, могут выступать различные лекарственные вещества, такие как гормон роста, тироксин, эстрадиол, холестерамин, казеин, а также избыточное потребление жира или длительное голодание.

Клинические проявления разных генетических вариантов сходны (ярко-желтые ксантомы в области сухожилий мышц верхних и нижних конечностей, а также периорбитальный ксантелизм) и обусловлены отложением липидов на стенках сосудов, а также в коже, сухожилиях и связках (рис. 23.10). По краю роговицы часто определяется липоидная дуга. Однако наиболее тяжелые последствия возникают при появле-

Рис. 23.10. Ксантомы верхних (*а*) и нижних (*б*) конечностей у больных с семейной гиперхолестеролемией (Из: Ch. R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, 2001)

нии атеросклеротических бляшек в коронарных артериях и аорте. Это в большинстве случаев приводит к возникновению ишемической болезни сердца в молодом или даже детском возрасте. Наиболее тяжелая клиническая картина наблюдается у гомозигот по мутациям в гене рецептора ЛПНП. У этих больных патологические симптомы появляются в более раннем возрасте, быстро прогрессируют и приводят к укорочению продолжительности жизни больного. Лабораторная диагностика заболевания основана на определении концентрации общего холестерола в плазме крови больных. У гомозигот этот показатель составляет 600–1000 мг/дл, в то время как у гетерозигот этот показатель не превышает 350–550 мг/дл.

23.5. НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ ЭРИТРОНА

В эту группу заболеваний включают все гемолитические анемии, как несфероцитарные, обусловленные дефектами ферментных систем эритроцитов, так и сфероцитарные, связанные с наличием аномальных типов гемоглобина или белков эритроцитарных мембран.

23.5.1. НЕСФЕРОЦИТАРНЫЕ АНЕМИИ

К особенностям этой группы заболеваний, отличающим ее от других гемолитических анемий, следует отнести отсутствие чувствительности эритроцитов к осмотическому шоку, сохранение нормальной формы эритроцитов и структуры гемоглобинов. Наиболее распространенная причина несфероцитарных анемий – дефекты в генах эритроцитарных ферментов (глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, пируваткиназы, фосфофруктокиназы, гексокиназы, гексофосфатизомеразы и др.). Известно, что нормальная работа эритроцитарных ферментов необходима для успешного гликолиза – процесса, в ходе которого образуется АТР, обеспечивающий эритроцит энергией. По пути анаэробного гликолиза метаболизируется около 90% всей глюкозы эритроцитов. Остальные 10% метаболизируются по аэробному пентозо-фосфатному пути. Нарушения функционирования хотя бы одного из ферментов метаболического расщепления глюкозы эритроцита может привести к гемолитической анемии. Описаны различные типы наследования несфероцитарных анемий – аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный и Х-сцепленный рецессивный. Наиболее распространенным заболеванием этой группы является эритроцитарная энзимопатия, обусловленная недостаточностью глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г6ФД), которую мы рассмотрим в данной главе.

23.5.1.1. НЕДОСТАТОЧНОСТЬ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТ-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ (OMIM: 305900)

аболевание наследуется по Х-сцепленному рецессивному типу. Это одна из наиболее аспространенных наследственных болезней человека. Показано, что около 100 млн. еловек на Земном шаре несет мутацию в гене *Г6ФД*. Наибольшее распространение заолевание получило в странах Средиземноморья, Ближнего и Среднего Востока, Се-ерных регионов Африки и Юго-Восточной Азии. Этому способствовали две основые причины – устойчивость носителей мутации в гене *Г6ФД* к малярии, чрезвычайно аспространенной в этих регионах, и высокая частота кровиородственных браков.

Ген *Г6ФД* локализован в области хромосомы Xq28 и содержит 13 экзонов. Описао более 300 различных мутаций в гене, приводящих к значительному клиническоу полиморфизму заболевания.

В основе патогенеза болезни лежит снижение активности фермента Г6ФД. Этот ермент катализирует первый этап окисления глюкозы по аэробному пентозофосатному пути, в результате которого происходит превращение β-D-глюкозо-6-фосата в 6-фосфоглюконолактон. Окисление глюкозы по этому пути приводит к образованию NADPH, необходимого для синтеза жирных кислот, стероидов, а также рибозо-5-фосфата, участвующего в синтезе нуклеотидов и нуклеиновых кислот. В эритроцитах NADPH принадлежит существенная роль в образовании восстановленно-о глутатиона, разрушающего перекись водорода в ходе реакции, катализируемой лутатионпероксидазой. Накопление перекиси водорода в эритроцитах может сократить время их жизни (путем повышения скорости окисления гемоглобина в метемоглобин) и снизить устойчивость эритроцита к воздействию свободных радикалов и различных окислителей. При поступлении в организм различных лекарственых и пищевых веществ, обладающих оксидантным действием, эритроциты набухают и подвергаются гемолизу. К лекарственым препаратам, провоцирующим возникновение гемолитических кризов, относят: противомалярийные препараты (примаин, хинин), противотуберкулезные препараты, анальгетики и жаропонижающие, витамин С, нитроглицерин, невиграмон, 5-НОК, некоторые виды антибиотиков и сульфаниламидов. В ряде случаев гемолиз может индуцироваться инфекционными агентами и токсинами, а также пищевыми продуктами, например бобами (*Vicia faba*).

Клиническая картина характеризуется желтухой, ознобом, лихорадкой, головной болью и рвотой, возникающими после попадания в организм повреждающего агента. В крови больного в момент приступа выявляются: нормохромная анемия, ретикулоцитоз, увеличение концентрации непрямого билирубина, лейкоцитоз. Симптомы заболевания могут появиться в любом возрасте, в том числе в первые дни жизни, и имитировать гемолитическую болезнь новорожденных. В ряде случаев, при массивном гемолизе и увеличении частоты кризов возникают осложнения, связанные с патологическим воздействием продуктов распада эритроцитов на клетки печени, селезенки, а также почечные канальцы. Осложнения, как правило, возникают через 4–5 дней после приема препаратов или пищевых продуктов. Длительность гемолитического криза не превышает 7–12 дней. Исчезновение симптомов происходит после замены гемолизированной популяции эритроцитов вновь образованной.

Выделяют несколько клинических вариантов болезни, для которых характерен различный уровень активности фермента в крови гемизиготных носителей и варьирующая тяжесть клинических проявлений. Показано, что наиболее выраженное снижение активности фермента возникает при мутациях, локализованных в 8- или 10-ом экзонах гена. Эти варианты дефицита Г6ФД характеризуются тяжелыми гемолитическими кризами, провоцируемыми широким кругом лекарственных препаратов и пищевых продуктов. В ряде случаев, например при варианте Фрейбург, гемолиз эритроцитов возникает с рождения и происходит практически постоянно, независимо от приема лекарственных препаратов.

Диагностика заболевания включает физикальное обследование, определение активности фермента в гемолизате, его электрофоретической подвижности и термостабильности, степени образования восстановленной формы NADP$^+$ (NADPH). Для подтверждения диагноза проводят ДНК-анализ, направленный на обнаружение мутации в гене Г6ФД.

Профилактика возникновения гемолитических кризов заключается в полном отказе от приема лекарственных препаратов и пищевых продуктов, обладающих гемолитическим действием. Лицам с низким уровнем активности Г6ФД противопоказаны прививки и донорство.

23.5.2. СФЕРОЦИТАРНЫЕ ГЕМОЛИТИЧЕСКИЕ АНЕМИИ

Это группа заболеваний, общим признаком которых является с одной стороны гемолиз эритроцитов, а с другой – реактивно усиленный эритропоэз. При исследовании мазка крови больного обнаруживаются эритроциты аномальной структуры (в

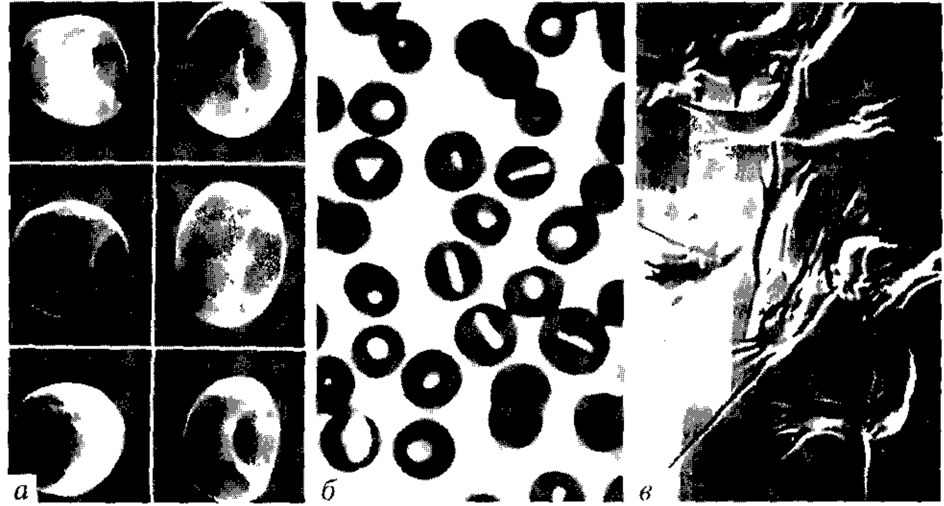


Рис. 23.11. Аномальные эритроциты при сфероцитарных гемолитических анемиях. (Из: *Н.С. Кисляк, Р.В Ленская, 1978*):

а – при талассемиях; б – мишеневидные эритроциты в мазке крови; в – серповидноклеточные эритроциты в мазке крови

том числе сфероцитарные, мишеневидные, серповидные и другие) (рис. 23.11.). Увеличение количества продуктов распада эритроцитов проявляется желтушным окрашиванием кожи и слизистых и повышением концентрации в крови непрямого билирубина и железа. В этой группе можно выделить две подгруппы *гемоглобинопатии*, обусловленные изменением структуры гемоглобина, и *мембранопатии*, связанные с аномалией белковых и липидных компонентов эритроцитарной мембраны.

23.5.2.1. ГЕМОГЛОБИНОПАТИИ

Гемоглобинопатии - группа наследственных заболеваний, этиологическим фактором которых являются мутации в генах, кодирующих полипептидные цепи глобиновых белков. При различных вариантах гемоглобинопатий гемоглобин либо приобретает неправильную форму, либо в его составе меняется соотношение глобиновых цепей. Известно, что глобин – это белок, содержащий четыре полипептидные цепи. Гемоглобин человека гетерогенен, что связано с различием его полипептидных цепей. В норме у взрослого человека 95%–98% всего гемоглобина составляет HbA, в состав которого входях две α и две β цепи. Таким образом, его формула записывается как HbA (α_2; β_2). От 2% до 2,5% приходится на долю Hb A_2, имеющего формулу (α_2; δ_2) и лишь 0,1–2% гемоглобинов у взрослого человека составляет фетальный HbF(α_2; γ_2). В период эмбриогенеза соотношение гемоглобинов бывает совершенно другим и, кроме того, присутствуют такие его формы, которые никогда не встречаются в постнатальном периоде. Например, у плода до 18-недельного возраста имеется Hb Gower 2 (α_2; ε_2), в состав которого входит отсутствующая у взрослых ε-полипептидная цепь. С 20-ой недели внутриутробной жизни плода происходит постепенная замена этого типа гемоглобина на HbF (α_2; γ_2), который доминирует у плода и новорожденных детей. Замена фетального гемоглобина на гемоглобин А происходит в течение первого года жизни ребенка.

Существует множество генетических механизмов возникновения заболеваний этой группы, обусловленных особенностями расположения генов глобиновых белков и сложным контролем их транскрипции. Для α-цепи имеется два дуплицированных гена, расположенных на хромосоме 16p13.3-pter – (α_1 и α_2). Гены β-глобиновой цепи образуют на хромосоме 11p15.4-15.5 кластер. Последовательность генов соответствует этапам их экспрессии от периода эмбриогенеза до взрослого возраста - первым располагается ген ε-цепи, затем два гена γ-цепей (γ-G и γ-A), δ и β. Продукты этих генов вместе с α-глобиновой цепью формируют различные типы гемоглобинов. Очередность такой экспрессии, по-видимому, регулируется генами контролирующих регионов, расположенных в промоторной области на некотором расстоянии от 5′-конца этого кластера. При наличии мутаций, обусловливающих снижение или полное прекращение экспрессии той или иной глобиновой цепи, возникает повышенная экспрессия других генов кластера. В результате образуются гемоглобины, не свойственные этому возрастному периоду. Заболевания, при которых количество α- или β-глобинов уменьшено или они полностью отсутствуют и заменены в молекуле

гемоглобина другими цепями (например, γ или δ), называют **средиземноморскими ли хорадками, или талассемиями** (от греческого слова «таласса», которым в древност называли Средиземное море). В зависимости от нарушения синтеза α- или β-глоби новых цепей выделяют α- или β-талассемии. Эти заболевания составляют значи тельную часть в структуре гемоглобинопатий и представлены множеством аллель ных вариантов, возникающих в результате точковых мутаций в генах глобиновых це пей. К настоящему времени описано более 300 таких мутаций, большинство и з ни очень редки. Наиболее выраженные клинические проявления обусловлены мутаци ями, затрагивающими функционально значимые участки белковой молекулы (т. теми мутациями, которые нарушают формирование вторичной и третичной структу ры глобина или аминокислотную последовательность в местах прикрепления гем или контактах цепей друг с другом. К наиболее распространенным аллельным вари антам гемоглобинопатий, помимо талассемий можно отнести серповидноклеточну анемию, метгемоглобинемию и эритроцитоз.

Приводим основные клинико-генетические характеристики некоторых гемогло бинопатий.

α-ТАЛАССЕМИЯ (OMIM:141850). Группа заболеваний, обусловленных мутаци ями в генах α-глобиновых цепей. Наиболее часто возникают крупные делеции, за хватывающие 1,2,3 или 4 копии генов. Как указано выше, имеется четыре копии ге на α-цепей (по две для α_1 и α_2 цепей). Клинические проявления α-талассемии вари ируют в зависимости от протяженности делеции. При наличии делеции, захватыва ющей одну копию генов, клинические проявления, как правило, не возникают, де леция двух копий приводит к возникновению микроцитоза, трех — обусловливае типичную клиническую картину заболевания в виде хронической гемолитическо анемии и сопровождается образованием новых типов гемоглобинов, например HbI состоящего из четырех β-цепей ($Hb\beta_4$) Протяженная делеция, захватывающая 4 ко пии α-глобиновых генов, приводит к полному отсутствию α-цепей и образовани несовместимого с жизнью гемоглобина, состоящего из четырех γ-цепей ($Hb\gamma_4$). ряде случаев, при наличии мутаций, затрагивающих район α-цепей, важный для осу ществления их контактов с β-цепями, возникает тетрамер из двух γ– и двух α-цепе

Типичные клинические проявления α-талассемии у гетерозигот по мутации в с цепях характеризуются хронической гемолитической анемией средней тяжести. Ге молиз эритроцитов возникает в результате перегрузки клеток эритроидного ростка внутренних органов железом, что приводит к неэффективному эритропоэзу и оказ вает повреждающее действие на мембрану эритроцитов. Анемия часто обостряет при возникновении интеркуррентных инфекций и приеме некоторых лекарствен ных препаратов, например, сульфаниламидов. У 80% больных возникает спленоме галия, а у 30% деформации скелета.

β-ТАЛАССЕМИЯ (OMIM: 141900). Группа заболеваний, обусловленных мутаци ями в генах β-глобиновых цепей. В зависимости от типа мутации и наличия или о сутствия β-глобиновых цепей выделяют несколько клинико-генетических вариан тов β-талассемий. Первый вариант обозначается как β^0-талассемия. Он возника вследствие нонсенс-мутаций и сплайсинговых мутаций, а также мутаций, привод щих к сдвигу рамки считывания. Второй вариант — β^+-талассемия. Его причин служат мутации в промоторной области гена, в 5′- и 3′-нетранслируемых региона

ТАТА-, СААТ- и САССС-боксах. В результате таких мутаций происходит уменьшение или прекращение синтеза β-глобиновых цепей и замена их в молекуле гемоглобина α- и γ-цепями.

Один из редких вариантов β-талассемии связан с персистированием фетального гемоглобина, при котором не происходит его замена на гемоглобин взрослого. Известно несколько типов персистирующего фетального гемоглобина: 1) гемоглобин представлен двумя γ-цепями (G и A), при этом δ- и β-цепи отсутствуют; 2) гемоглобин в основном представлен γG- и δ-цепями, при этом ген β-цепи функционально активен; 3) гемоглобин представлен γG- и γA-цепями, а β-цепи отсутствуют. Показано, также, что возникновение симптомов талассемии (так называемых γ-, δ-, β-талассемий) может быть обусловлено делецией в регуляторном элементе глобиновых генов. Предполагается, что этот регион, обозначаемый аббревиатурой LCR, находится на расстоянии 100 т.п.н. от кластера глобиновых генов и контролирует его экспрессию в ходе развития.

Клинические симптомы β-талассемий разнообразны и зависят от типа мутаций в гене β-глобиновых цепей. Большая талассемия β^0 (анемия Кули), как правило, проявляется в возрасте 2–6 лет. У больных отмечается задержка роста, гепатоспленомегалия, дизморфические черты строения черепа и лица – результат остеопороза во внутриутробном периоде. Гемолиз проявляется желтушной окраской кожи и слизистых оболочек, приступами лихорадки. Анализ крови демонстрирует тяжелую гипохромную анемию, снижение содержания гемоглобина, уменьшение количества эритроцитов и изменение их морфологии (мишеневидные эритроциты, пойкилоцитоз, анизоцитоз, шизоцитоз, фрагментация и нормобластоз (см. рис. 23.11). Часто при большой талассемии возникают осложнения в виде трофических язв, цирроза печени, мочекислого диатеза и гемосидероза.

Для определения генетического варианта α- и β-талассемий и выявления гетерозиготного носительства проводят молекулярно-генетический анализ мутаций в гене α- и β-глобиновых цепей. Возможна дородовая диагностика талассемий на раннем сроке беременности на основании анализа ДНК, выделенной из клеток плода.

СЕРПОВИДНОКЛЕТОЧНАЯ АНЕМИЯ. Серповидноклеточная анемия (СА) – группа генетически гетерогенных заболеваний, возникающих у гомо- и гетерозигот по мутации в гене β-глобина , детерминирующей серповидную форму эритроцитов. Это заболевание было впервые описано в 1910 году. Наибольшее количество гетерозиготных носителей аномального гемоглобина (HbS) обнаружено в эндемичных по малярии регионах планеты – в Центральной Африке, Средиземноморье, Индии, странах Ближнего и Среднего Востока, что связано с устойчивостью обладателей такого генотипа к малярии. Около 8% афроамериканцев гетерозиготны по HbS. Причиной образования гемоглобина S является точковая мутация, в результате которой в 6-ом положении полипептидной цепи β-глобина аминокислота валин заменяется на глутамин. Эта замена приводит к пониженной растворимости гемоглобина и повышению его полимеризации, что в свою очередь обусловливает изменение формы эритроцитов на серповидную. Такие эритроциты становятся ригидными, теряют пластичность, закупоривают мелкие сосуды и гемолизируются. Закупорка сосудов часто приводит к образованию очагов ишемии, а при длительном течении заболевания – инфарктов во внутренних органах, костном мозге и головном мозге. Заболе-

вание часто имеет приступообразное течение. Появление ишемических кризов часто провоцируется тканевой гипоксией, снижением рН крови, повышением температуры тела и замедлением кровотока. Обычно выделяют несколько фаз криза: *ишемическую*, длительностью до шести часов; *инфарктную*, длительностью до 3 суток; *микроэмболическую*, длительность которой варьирует у различных больных от недели до месяца. Типичными симптомами ишемической фазы являются сильные боли в позвоночнике, крупных суставах, костях. Если в начале этой фазы начать интенсивное лечение, то возникновение других фаз заболевания можно предотвратить. При отсутствии лечения или недостаточной терапевтической эффективности используемых препаратов возникает инфарктная фаза, во время которой боли усиливаются. Появляются лихорадка и симптомы вегето-сосудистой дистонии. Для микроэмболической фазы характерны симптомы закупорки кровеносных сосудов, клинические проявления варьируют в зависимости от локализации участка эмболии. В межприступный период у больных регистрируется умеренная нормохромная анемия. К наиболее грозным осложнениям заболевания можно отнести инсульты мозга, остеомиелит, переломы конечностей, калькулезный холецистит.

Диагностика заболевания основывается на типичных клинических симптомах, выявлении серповидных эритроцитов в крови, а также обнаружении мутаций в гене β-цепи гемоглобина при проведении молекулярно-генетического анализа.

23.5.2.2. ЭРИТРОЦИТАРНЫЕ МЕМБРАНОПАТИИ

Одна из наиболее распространенных мембранопатий – микросфероцитарная анемия Минковского–Шоффара (OMIM:182900). Ее частота составляет 2:10 000 новорожденных. Это генетически гетерогенная группа гемолитических сфероцитарных анемий, две из которых встречаются чаще других: первая обусловлена мутациями в гене белка спектрина, вторая связана с мутациями в гене белка анкирина. Оба эти белка обеспечивают целостность мембраны эритроцитов и ее устойчивость к деформации. Схема расположения белков мембраны эритроцита представлена на рис. 23.12. Спектрин представляет собой тетрамер из 2137 аминокислот, состоящий из двух неидентичных цепей – α и β. Анкирин, состоящий из 1880 аминокислот, обеспечивает связь с липидными слоями мембраны и пространственную ориентацию спектрина и его взаимодействие с цитоплазматическими белками. Ген α-цепи спектрина локализован на хромосоме 1q21, β-цепи – на хромосоме 14 q22-q23, а ген анкирина – в области хромосомы 8p11.2. Мутации в гене α-цепи спектрина и промоторном районе гена анкирина приводят к возникновению редких аутосомно-рецессивных вариантов сфероцитоза, а мутации в гене β-цепи спектрина вызывают распространенный аутосомно-доминантный вариант сфероцитоза первого типа. В результате мутаций в гене спектрина и анкирина нарушается поверхностная структура мембраны эритроцитов и снижается мембранный индекс, что приводит к появлению сферической формы эритроцитов. Микросфероциты не обладают пластичностью нормальных эритроцитов и задерживаются при прохождении из пульпы селезенки в венозные сосуды.

Клинические проявления сфероцитарных анемий часто возникают в старшем школьном и юношеском возрасте и характеризуются эпизодами желтухи, сопрово-

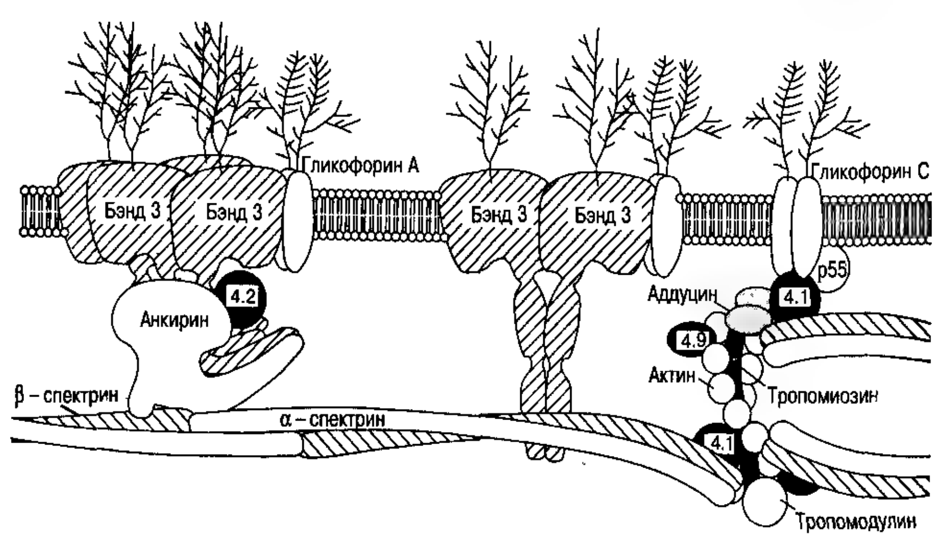


Рис. 23.12. Расположение белков мембраны эритроцитов

ждающейся потемнением мочи и появлением интенсивно окрашенного кала. По мере прогрессирования заболевания возникают гепатомегалия и спленомегалия. В редких случаях на коже голеней больных образуются длительно незаживающие язвы. В далеко зашедших случаях может развиться желчекаменная болезнь. Анализ крови больных свидетельствует об анемии, в препаратах выявляются эритроциты сферической формы, имеющие пониженную осмотическую резистентность (см. рис. 23.11).

В настоящее время наиболее эффективный метод лечения – спленэктомия, после которой происходит купирование большинства клинических признаков.

Диагностика заболевания осуществляется на основании характерных клинических проявлений, обнаружения эритроцитов сферической формы в крови больного, а также ДНК-анализа, направленного на идентификацию мутаций в генах спектрина и анкирина.

23.6. ЛИЗОСОМНЫЕ БОЛЕЗНИ

Ферменты и ферментные системы обычно локализованы в определенных клеточных структурах (лизосомах, пероксисомах, митохондриях). Нарушение в работе таких ферментов приводит к неспособности органелл выполнять свойственные им функции. В связи с этим принято выделять лизосомные, пероксисомные и митохондриальные болезни. Особенности клинических проявлений митохондриальных заболеваний описаны в гл. 22. В данном разделе будут рассмотрены некоторые лизосомные болезни накопления. Лизосомы представляют собой специализированные цито-

плазматические мембранные структуры, основная функция которых – ферментативное расщепление различных макромолекул. Гидролитическая активность лизосомных ферментов столь высока, что если бы мембрана лизосом разрушилась, то клетка тотчас бы подверглась самоперевариванию. Наибольшее распространение среди лизосомных болезней имеют мукополисахаридозы, обусловленные нарушением катаболизма гликозамингликанов в различных тканях больного, и сфинголипидозы, возникающие при нарушении обмена сфинголипидов.

23.6.1. МУКОПОЛИСАХАРИДОЗЫ

Мукополисахаридозы (МПС) – большая группа моногенных наследственных заболеваний, обусловленных нарушением многоступенчатого процесса ферментативного катализа гликозамингликанов (ГАГ) в лизосомах. ГАГ представляют собой сложные гетеросахара, состоящие из длинных полисахаридных цепей, построенных и остатков глюкуроновой кислоты и сульфатированного гексозамина. К гликозамингликанам относятся дерматансульфат, гепарансульфат, кератансульфат, а также хондроитин-4- и хондроитин-6-сульфат.

Впервые заболевание этой группы было описано Гурлером в 1917 году. К настоящему времени идентифицировано 10 генетических вариантов МПС. Пять из них обусловлены нарушением активности сульфатаз, четыре – гликозидаз и один вариант возникает при дефиците трансферазы.

На рис. 23.13. представлена схема обменных превращений дерматансульфата кератансульфата и гепарансульфата, указаны основные ферментативные блоки, обусловливающие возникновение некоторых видов МПС. Нарушение активности различных ферментов приводит к увеличению экскреции с мочой различных типов ГАГ. Повышение их концентрации дает основание для предварительного диагноза МПС и позволяет спланировать последовательность проведения энзимодиагностики.

В табл. 23.3. представлены сводные данные о генетических и биохимических характеристиках при различных вариантах МПС.

Появление клинических симптомов после периода нормального развития свойственно большинству болезней накопления. Это связано с достижением критического уровня нерасщепленного субстрата в лизосомах. При исследовании биоптатов различных тканей обнаруживаются увеличенные в размере лизосомы, представляющие собой раздутые вакуоли.

Все МПС наследуются аутосомно-рецессивно и лишь болезнь Хантера (МПС второго типа) наследуется Х-сцепленно рецессивно.

Клинические признаки при различных вариантах МПС имеют значительное сходство и становятся заметными к 2 3 летнему возрасту. Среди них: 1) грубые черты лица (гаргоилизм), 2) задержка роста (нанизм), 3) диспропорциональное строение скелета, деформации позвоночника (кифозы, сколиозы); 4) контрактуры суставов, 5) гепатоспленомегалия, 6) пахово-мошоночные грыжи, 6) снижение слуха (кондуктивная тугоухость), 7) помутнение роговицы.

Некоторые генетические варианты МПС сопровождаются снижением интеллекта. Сочетание отмеченных клинических признаков при разных нозологических фор

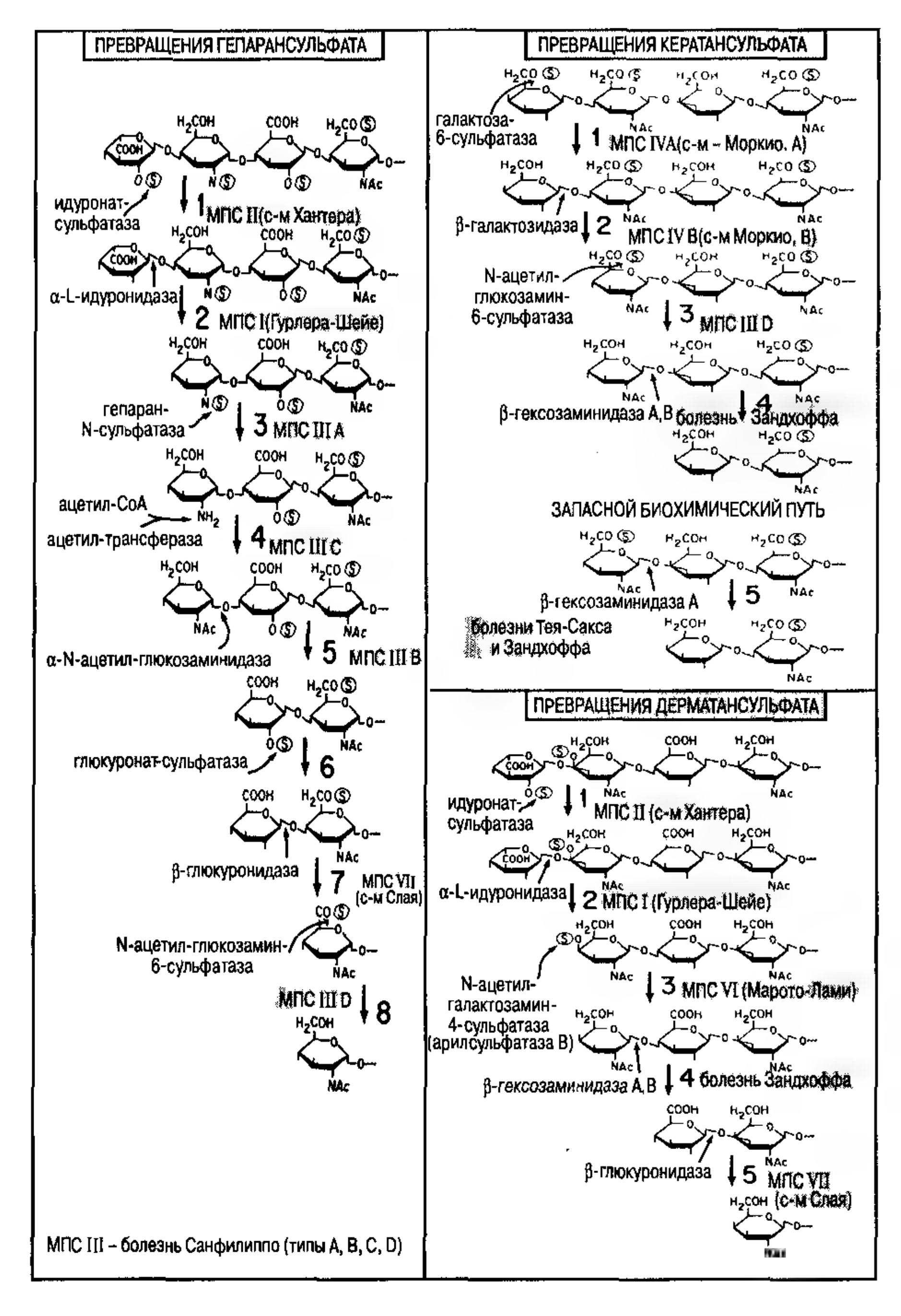


Рис. 23.13. Схема обменных превращений некоторых гликозаминогликанов и с ные ферментативные блоки, приводящие к возникновению мукополисахаридозов

Таблица 23.3. **Характеристика биохимических маркеров различных типов мукополисахаридозов**

Тип	OMIM	Фермент	Ген	ГАГ
1Н Гурлера	252800	α-L-идуронидаза	4p16.3	ДС, ГС
1S Шейе	–			ДС, ГС
2 Хантера	309900	Идуронатсульфатаза	Xq28	ДС, ГС
3А Санфилиппо	252900	Гепаран-N-сульфатаза	17q25.3	ГС
3В Санфилиппо	252920	α-N-ацетилглюкозаминидаза	17q21	ГС
3С Санфилиппо	252930	α-ацетил-СоА:глюкозамин-Ацетилтрансфераза	–	ГС
3Д Санфилиппо	252940	N-ацетилглюкозамин-6-сульфатаза	12q14	ГС
4А Моркио	253000	Галактозамин-6-сульфатаза	16q24.3	КС, Х6С
4В Моркио	230500	β-галактозидаза 1	22q13-qter	ГАГ в норме
6 Марото-Лами	253200	Арилсульфатаза В	5q13-q14	ДС
7 Слая	253220	β-глюкуронидаза	7q21.1-q22	ДС, ГС, Х6С, Х4С
I-клеточная болезнь (муколипидоз 2 типа)	252500	N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансфераза	4q21-23	Умеренное повышение всех ГАГ

мах этой группы заболеваний варьирует. Первый тип МПС характеризуется наличием двух аллельных вариантов – болезни Гурлера и болезни Шейе. Они обусловлены разными мутациями в одном и том же гене. Клинические проявления этих двух вариантов значительно отличаются друг от друга. Так, при МПС Гурлера у больного есть все вышеперечисленные симптомы, характерные для мукополисахаридозов в целом (рис. 23.14). Течение заболевания тяжелое, прогрессирующее; продолжительность жизни больных снижена. При синдроме Шейе симптомы, характерные для мукополисахаридозов, выражены незначительно; заболевание имеет доброкачественное течение.

МПС 2-го типа (*болезнь Хантера*) по клинической картине и тяжести течения напоминает МПС 1-го типа.

Фенотипические проявления МПС 3-го типа (*болезни Санфилиппо*) обусловлены снижением активности четырех ферментов, участвующих в процессе деградации гепарансульфата. В соответствии с этим выделяют четыре генетических формы, которые практически невозможно отличить при клиническом обследовании больного. Для этого типа МПС наиболее характерны симптомы, связанные с поражением нервной системы: снижение интеллекта, повышенная возбудимость, нарушение сна и спастическая диплегия. Как правило, у больных снижен слух. Гаргоилизм для этой формы заболевания не типичен, однако, отмечается гепатоспленомегалия и не резко выраженные изменения скелета.

Особенностью клинических проявлений МПС 4-го типа (*болезни Моркио*) являются выраженные скелетные деформации: резкое укорочение туловища, приводящее к значительному снижению роста больного, деформация позвоночника и грудной клетки, укорочение шеи, контрактуры и деформации суставов. Такие значительные деформации позвоночника нередко вызывают симптомы сдавления спинного мозга в спинно-мозговом канале. Интеллект больных, как правило, не страдает.

Рис. 23.14. МПС Гурлера. (Из: Ch. R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, 2001)

Клинические проявления мукополисахаридоза 6-го типа (*болезни Марото -Лами*) в значительной степени сходны с таковыми при МПС 1-го типа, однако, клинические симптомы появляются позднее и темп прогрессирования заболевания более медленный. Кроме того, для этого варианта МПС не характерно снижение интеллекта.

23.6.1.1. I-КЛЕТОЧНАЯ БОЛЕЗНЬ (OMIM:252500)

I-клеточная болезнь – это особая форма болезней накопления, обусловленная нарушением обмена гликозамингликанов. Это название заболевание получило в связи с выявлением в биоптатах больных характерных включений (I – от англ. «inclusion» – включение). Лизосомы с избыточной концентрацией нерасщепленных продуктов придают клеткам своеобразный «раздутый» вид. Возникновение клинических проявлений обусловлено мутацией в гене фермента, обеспечивающего присоединение маннозо-6-фосфатной группировки к лизосомным гидролазам для их транспорта. Показано, что именно эта маркерная группировка, находящаяся в составе фермента, узнается рецептором мембран лизосом. Отсутствие этой группировки приводит к увеличению концентрации лизосомных ферментов в жидких средах организма и ее снижению в тканях. Клиническая картина этого варианта болезней накопления сходна с МПС 1-го типа.

23.6.2. СФИНГОЛИПИДОЗЫ

Сфинголипидозы (СЛ) - группа наследственных заболеваний, которая обусловлена снижением активности ферментов, обеспечивающих деградацию сфингомиелинов – галактозидов и цереброзидов. Сфингомиелины - сложные липиды, основным структурным компонентом которых является церамид. Разнообразие сфинголипидов объясняется различиями в структуре компонентов, присоединяющихся к церамиду, главным образом гексоз. В настоящее время идентифицировано несколько нозологических форм СЛ, сводные данные о них представлены в табл. 23.4.

Таблица 23.4. **Нозологические формы сфинголипидозов**

Болезнь	OMIM	Фермент	Ген	Тип наследования
Метахроматическая лейкодистрофия	250100	Арилсульфатаза А	22q13.31	АР
Метахроматическая лейкодистрофия		Просапозин	10q21-22	АР
Лейкодистрофия Краббе	245200	β-галактозидаза	14q21-31	АР
Болезнь Гоше				
Тип I	606463	β-глюкозидаза	1q21	АР
Тип II	230900			
Тип III	231000			
Болезнь Ниманна - Пика				
тип А и тип В	257200	Сфингомиелиназа	11p15	АР
тип С	257220	Мембраносвязанный стеролчувствительный белок	18q11-12	АР

В качестве примера сфингомиелинозов рассмотрим одно из заболеваний из группы лейкодистрофий, обусловленных поражением белого вещества головного мозга – метахроматическую лейкодистрофию.

23.6.2.1. МЕТАХРОМАТИЧЕСКАЯ ЛЕЙКОДИСТРОФИЯ (МЛД) (OMIM: 250100)

Лейкодистрофии – это группа заболеваний, характеризующихся прогрессирующим поражением белого вещества головного мозга и глии (в слове «лейкодистрофия» корень «лейко» происходит от латинского слова leucos – белый). Первое описание МЛД было сделано Альцгеймером в 1919 году. Тип наследования заболевания аутосомно-рецессивный. В основе патогенеза большинства случаев МЛД лежит мутация в структурном гене фермента арилсульфатазы А, картированном на хромосоме 22q13.31-qter и содержащем 8 экзонов. К настоящему времени описано более 60 различных патологических мутаций, что свидетельствует о выраженной аллельной гетерогенности этого заболевания. Показано, что арилсульфатаза А обеспечивает гидролиз сульфата от цереброзилсульфатов (галактозил- и лактозилсульфатов) в лизосомах миелина центральной и периферической нервной системы, а также некоторых внутренних органов, прежде всего печени и почек. При возникновении блока этих обменных превращений происходит накопление субстратов в лизосомах, приводящее к нарушению функции нейронов. Наряду с классическим генетическим вариантом МЛД описано несколько случаев со снижением активности арилсульфатазы А вследствие мутации в гене просапозина, локализованном на хромосоме 10 и содержащем 15 экзонов. Показано, что продуктом этого гена являются четыре активаторных белка: сапозин А, В, С, D – один из которых, а именно сапозин В, регулирует активность арилсульфатазы А.

Рис. 23.15. Патологические проявления метахроматической лейкодистрофии (Из: Ch. R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, 2001)

а – очаги демиелинизации в белом веществе мозга на МРТ, б – метахроматические включения в цитоплазме нейрона

При гистологическом исследовании мозга больного обнаруживаются увеличенные в размерах лизосомы, содержащие гранулярные массы диаметром от 5 до 15 ммк, окрашивающиеся метахроматически. При прижизненном исследовании мозга с помощью метода магнитно-резонансной томографии обнаруживаются очаги демиелинизации, наиболее часто концентрирующиеся вокруг четвертого желудочка и субкортикально (рис. 23.15).

Клинические проявления МЛД полиморфны. Выделяют несколько вариантов, отличающихся возрастом начала, характером клинических симптомов и тяжестью течения.

Первый вариант встречается довольно редко и называется *врожденным*; клиническая картина разворачивается в возрастном диапазоне от рождения до 4-месячного возраста. Характерные симптомы: мышечная гипотония, снижение сухожильных рефлексов, эпизоды апноэ, цианоз и тонико-клонические судороги. Смерть больных наступает спустя несколько месяцев или даже дней от момента появления первых симптомов.

Второй вариант – наиболее распространенный, его называют *ювенильным*. Симптомы при этой форме заболевания становятся заметными в возрасте от 6 месяцев до 2 лет, после периода нормального психомоторного развития. У ребенка возникает мышечная гипотония; потеря ранее приобретенных двигательных навыков; прогрессирующая умственная отсталость; атрофия дисков зрительных нервов; корковая слепота, дизартрия, переходящая в афазию; атаксия; бульбарный или псевдобульбарный паралич и судороги. В терминальных стадиях заболевания мышечная гипотония сменяется мышечным гипертонусом с появлением спастического тетрапареза. Смерть больных наступает спустя 2–3 года от начала заболевания.

Взрослая форма начинается на втором-третьем десятилетии жизни. Клинические проявления заболевания характеризуются наличием выраженных психических нарушений в виде психозов, шизофреноподобных симптомов в виде бреда, слуховых галлюцинаций и деперсонализации. По мере прогрессирования заболевания к этим

симптомам присоединяется очаговая неврологическая симптоматика в виде мидных и экстрапирамидных симптомов, атрофии дисков зрительных нерво реза и энкопреза. Часто такие больные оказываются пациентами психиатри клиник. Смерть больных наступает через пять – десять лет от манифестации вания.

Диагноз МЛД основывается на типичных клинических проявлениях, н очагов поражения белого вещества на МРТ головного мозга, снижении акти арилсульфатазы А в лимфоцитах и культуре кожных фибробластов и повы уровня сульфатидов в моче больного. Молекулярно-генетическая диагност труднена в связи с выраженной аллельной гетерогенностью. В отягощенных возможно проведение дородовой диагностики на основе использования биохи ских методов.

23.7. ПЕРОКСИСОМНЫЕ БОЛЕЗНИ

Пероксисомные болезни – группа заболеваний, обусловленных нарушением туры и функции пероксисом, внутриклеточных органелл, присутствующих дой клетке организма за исключением зрелых эритроцитов. Около 50 фермен роксисом обеспечивают β-окисление очень длинноцепочечных жирных (ОДЦЖК), дикарбоновых кислот, пипеколиновой кислоты, простагландинов роксисомах происходят начальные этапы биосинтеза плазмалогенов, входя структуру миелина и составляющих от 5% до 20% фосфолипидов клеточных ран. Одна из важнейших функций пероксисом – защита клетки от образующ ней атомарного кислорода с помощью химических превращений, в которых у ют пероксисомные каталазы.

Возникновение пероксисомных болезней обусловлено нарушением сл ферментативных реакций внутри органелл, процессов транспорта белков чере браны органелл и функции их рецепторов. Белки, вовлеченные в биогенез пе сом, называют *пероксинами*. В настоящее время определены функции более 2(ксинов, для 9 из которых установлена хромосомная локализация кодирующих обозначаемых *PEX*. В большинстве случаев патогенетические механизмы пе сомных болезней связаны с нарушением четырех основных биохимических п сов – синтеза плазмалогенов, окисления ОДЦЖК и фитановой кислоты и де ции пипеколиновой кислоты. Особенностью пероксисомных болезней яв возникновение нескольких заболеваний при мутациях в одном и том же ген появление одного клинического фенотипа, при наличии мутаций в разных ге роксинов. Среди наиболее распространенных пероксисомных болезней цена ребро-ренальный синдром Цельвегера, ризомелическая точечная хондродист синдром Рефсума и вдренолейкодистрофия. Частота пероксисомных болезн ставляет 1: 25000-1:50000 новорожденных. На основании двух важных крите количества пероксисом в печени и степени нарушения их функций эти бо принято делить на три основные группы. К первой группе относятся пероксис

болезни, при которых количество пероксисом в печени значительно снижено, а биохимические процессы в них нарушены. Во вторую группу входят заболевания, характеризующиеся нарушением лишь нескольких биохимических процессов в пероксисомах и нормальным их количеством в печени. При заболеваниях третьей группы биологическая функция пероксисом полностью подавлена, но их количество в печени соответствует норме.

Клиническая картина пероксисомных заболеваний включает: 1) черепно-лицевые аномалии; 2) патологию органов зрения (нарушение пигментации сетчатки, побледнение дисков зрительных нервов); 3) неврологические симптомы (мышечная гипотония, судороги, задержка раннего психомоторного развития); 4) гепатомегалию; 5) аномалии скелета (ризомелический тип укорочения конечностей).

Для демонстрации особенностей проявления пероксисомных болезней приводим клинико-генетические характеристики церебро-гепато-ренального синдрома Цельвегера, относящегося к первой группе.

23.7.1. СИНДРОМ ЦЕЛЬВЕГЕРА (СЦ) (OMIM: 214100)

Этот синдром объединяет группу генетически гетерогенных состояний. К клиническим проявлениям СЦ могут приводить мутации в генах пероксинов 1, 2, 3, 5, 6 и 12. Все варианты СЦ наследуются по аутосомно-рецессивному типу.

Первые симптомы отмечаются с рождения. Для больных характерна внутриутробная гипотрофия (вес при рождении не превышает 2500 г), дисморфизм в строении лица и черепа – увеличение размеров лба, монголоидный разрез глаз, периорбитальная полнота тканей, короткий вздернутый нос, микрогнатия. Среди наиболее типичных признаков: резкая мышечная гипотония, доходящая до атонии, и поликистоз почек. У всех больных отмечаются полиморфные пороки развития головного мозга. Часто диагностируется полимикрогирия, лизэнцефалия, агенезия мозолистого тела, очаги демиелинизации в белом веществе мозга, гидроцефалия. В ряде случаев выявляется патология глаз в виде врожденных катаракт и глауком, а также пороки сердца и наружных половых органов. Для заболевания характерна длительная желтуха и симптомы нвдпочечниковой недостаточности в первые месяцы жизни. У всех детей отмечается грубая задержка раннего психомоторного развития и снижение продолжительности жизни. Большинство больных погибает в течение первого года.

При морфологическом изучении биоптатов печени больных выявляется характерный морфологический признак резкое снижение или полное отсутствие пероксисом в печени. Биохимический анализ демонстрирует значительное снижение активности основных групп ферментов, участвующих в синтезе плазмалогенов, метаболизме фитановой кислоты, β-окислении жирных кислот, деградации пипеколиновой кислоты. Важный диагностический признак СЦ, выявляемый при лабораторном обследовании, – повышение концентрации очень длинноцепочечных жирных кислот в плазме крови.

глава 24

ГЕНЕТИКА ШИРОКО РАСПРОСТРАНЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

24.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ШИРОКО РАСПРОСТРАНЁННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В последние годы большое внимание уделяется изучению генетических механизмов широко распространенных болезней, вносящих основной вклад в структуру заболеваемости и смертности человека. Доказана существенная роль генетических факторов в возникновении атеросклероза, эссенциальной гипертензии, сахарного диабета, бронхиальной астмы, различных форм рака, многих врожденных пороков развития и др. Большинство заболеваний этой группы имеют мультифакториальную природу, т.е., их клинические проявления возникают только в результате совместного действия некоторого числа генетических и средовых факторов. Такие болезни принято называть **болезнями с наследственной предрасположенностью (БНП)**. Эта патология в настоящее время приобретает все большее значение для медико-генетического консультирования и практического здравоохранения, так как в среднем около 10% населения страдает болезнями с наследственной предрасположенностью, а их доля среди общего числа случаев наследственной патологии человека достигает 90%.

В большинстве случаев наследственная предрасположенность формируется специфической комбинацией аллелей нескольких генов, вносящих вклад в развитие или модификацию клинических проявлений болезни. Участие нескольких генов в генетическом контроле может иметь форму их аддитивного действия, либо один из генов окажется главным, а остальные будут иметь модифицирующее влияние.

Предположение о полигенном характере наследования заболевания формируется на основании данных, полученных эмпирическим путем при использовании *классических методов медицинской генетики* (клинико-генеалогического, близнецового, популяционно-статистического) и основывается на различиях в средних значениях изучаемого количественного признака у носителей различных генотипов. Наибольшая вероятность реализации такой модели наследования имеет место в следующих случаях:

1) если конкордантность монозиготных близнецов вчетверо выше, чем конкордантность дизиготных близнецов;

2) если доля пораженных сибсов, рожденных в браках, где один из супругов поражен, в 2,5 раза выше, чем в браках здоровых лиц;

3) если наблюдаются различия в частоте пораженных среди мужчин и женщин, то в родословной пробандов реже поражаемого пола наблюдается увеличение количества пораженных родственников (это связано с тем, что проявление признака возможно при наличии меньшей генетической подверженности к заболеванию);

4) если в популяциях с высоким уровнем инбридинга распределение подверженности заболеванию имеет более значительную дисперсию.

24.2. МАТЕМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ БОЛЕЗНЕЙ С НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ (БНП)

Механизм развития заболеваний, обусловленных аддитивным действием генов, может быть описан с помощью различных математических моделей, главная из которых – полигенная модель с пороговым эффектом. Наиболее часто предрасположенность к заболеванию изучают, анализируя количественные признаки, распределение которых является нормальным. Предполагается, что существует непрерывный ряд значений таких признаков, которые можно измерить у больных и здоровых людей. В этом случае термином «порог» обозначают определенную границу в градуированном континууме подверженности заболеванию, за которой располагаются больные индивиды (рис. 24.1.). Необходимо отметить, что величина порога подверженности к тому или иному заболеванию может быть различна для лиц разного пола, возраста, национальности и расы. Возрастание восприимчивости к заболеванию, приводящее к превышению этого «порога», возникает в том случае, когда совокупность наследственных и средовых факторов приводит к нарушению гомеостаза и возникновению заболевания. Основными генетическими компонентами дисперсии являются: *аддитивная* (V_a), *доминантная* (V_d) и *эпистатическая* (V_i). Наряду с этим, учитываются две группы внешнесредовых факторов: *систематические* (компонента V_{ec}) и *случайные* (компонента V_{ew}). Таким образом фенотипическая (то есть, наблюдаемая) дисперсия – V_p признака может быть выражена формулой:

$$V_p = V_a + V_d + V_i + V_{ec} + V_{ew};$$

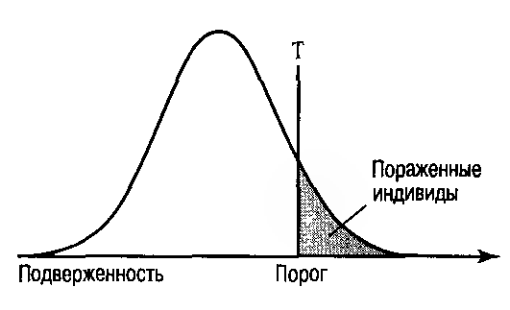


Рис. 24.1. Мультифакториальное наследование с пороговым эффектом

Подверженность заболеванию в общей популяции имеет нормальное распределение; индивиды справа от порога поражены болезнью

Для оценки вклада генетических факторов в предрасположенность к заболе-

ванию необходимо использовать коэффициент наследуемости (h^2), который может быть вычислен на основе показателей фенотипической дисперсии и является частным от деления V_a/V_p. Однако в большинстве случаев вычисление коэффициента наследуемости осуществляется через коэффициент корреляции (r) между родственниками различной степени родства. Например, $h^2 = 2r$ для пар родитель-ребенок. Расчет коэффициента корреляции проводится по формуле:

$$r = \frac{N\sum(X_i \times Y_i) - \left(\sum X_i \times \sum Y_i\right)}{\sqrt{\left[N\sum X_i^2 - \left(\sum X_i\right)^2\right]\left[N\sum Y_i^2 - \left(\sum Y_i\right)^2\right]}},$$

где X и Y – величины искомого признака у ребенка и родителя соответственно;

i = (1, 2, 3 ..., N) – номера пар «родитель–ребенок», N – общее число таких пар в выборке, суммирование ведется от 1 до N.

Такой коэффициент межклассовой корреляции определяет степень и направление взаимосвязанного варьирования признака в группе «родителей» и в группе «детей».

В 1965 г. Фолконер впервые предложил использовать эту модель для изучения признаков и заболеваний, имеющих только качественное выражение (то есть, признак или заболевание присутствуют или отсутствуют). В этом случае проводится сравнительный анализ частоты заболевания в популяции (g) и среди родственников больных (ra). Положение порога на нормальной кривой предрасположенности к заболеванию характеризуется частотой заболевания, выявленной в популяции. В этом случае необходимо рассчитать показатели отклонения порога и среднего значения предрасположенности для родственников больного от среднепопуляционного значения предрасположенности. Обозначив эти показатели через x и a, и выразив их в единицах стандартного отклонения x_g и a_g (рис. 24.2.), а также определив значение частоты заболевания у родственников – x_{ra}, с помощью таблиц нормального распределения, можно рассчитать коэффициент корреляции между пробандами и их родственниками по формуле:

$$r = \frac{x_g - x_{ra}}{a_g}.$$

Зная коэффициент корреляции, можно легко вычислить показатели наследуемости, как показано выше.

Необходимо отметить, что использование статистических математических методов в изучении полигенных признаков не позволяет решить вопрос о наличии генетической детерминированности признака. Результаты анализа дают представление о существовании и степени разнообразия в количественном выражении признака, обусловленного генетическими факторами. Если такое разнообразие выявлено и показано его значительное влияние на величину фенотипической дисперсии, то делается предположение о значительном вкладе генетических факторов в формирование межиндивидуальных различий по степени выраженности признака в той популяции, на материале которой проводится исследование.

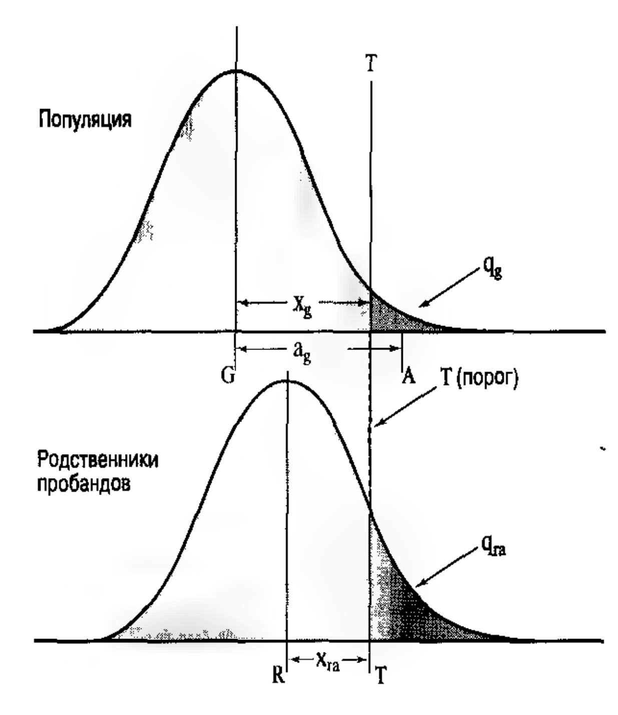


Рис. 24.2. Гипотетические кривые предрасположенности к мультифакториальному заболеванию в популяции и у родственников пробандов.

q_g – частота заболевания в популяции, q_{ra} частота заболевания у родственников,
G – среднее значение предрасположенности в популяции,
x_g – расстояние от среднепопуляционного значения предрасположенности до порога (T),
a_g – расстояние от среднепопуляционного значения предрасположенности до среднего значения предрасположенности у больных (A),
R среднее значение предрасположенности у родственников больных,
x_{ra} – расстояние от среднего значения предрасположенности у родственников больных до порога (T)

Безусловно, такие модели являются в значительной степени условными, так как подверженность большинству широко распространенных заболеваний имеет значительно более сложный механизм.

24.3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ БНП

В последние годы, в результате интенсивного развития молекулярно-генетических методов удается идентифицировать гены, мутации в которых вносят существенный вклад в предрасположенность к развитию различных мультифакториальных болезней. Показано, что при ряде БНП вклад одного из генов полигенной системы в реализацию заболевания настолько велик, что можно говорить об эффекте «главного гена», который наиболее важен для формирования наследственной предрасположенности.

Однако, учитывая мультифакториальную природу этой группы заболеваний, считается, что наличие этого гена необходимо, но не достаточно для развития заболевания.

Таблица 24.1. **Редкие моногенные формы некоторых широко распространенных заболеваний**

Заболевание	Редкая форма	Гены	OMIM
Гиперлипидемия (ИБС)	Семейная гиперхолестеролемия	*LDLR*, 19p13.2-p13.1	143890
	Семейный дефект Apo-B-100	*apo*-B, 2p23-p24	107730
Эссенциальная гипертензия	Гипертензия, купируемая глюкокортикоидами	Неравный кроссинговер между генами альдостерон-синтазы и 11-β-гидроксилазы	103900
	Синдром Лиддла (псевдоальдостеронизм)	Гены эпителиального натриевого канала (*SCNN2,SCNN3*)	177200
	Псевдогипоальдостеронизм, тип 2 (синдром Гордона)		
	Синдром избытка минералокортикоидов	Ген почечной 11-β-гидроксистероид-дегидрогеназы	218030
Инсулинонезависимый сахарный диабет (ИНЗСД)	MODY 1	*HNF4A*	125850
	MODY 2	Ген глюкокиназы (*GCK*)	125851
	MODY 3	Ген ядерного фактора гепатоцитов	600496
	MODY 4	Ген фактора-1 промотора инсулина	606392
	MODY 5	Ген печеночного фактора транскрипции 2	605284
	MODY 6	Ген NEURODY	606394

Предположение о наличии главного гена может быть высказано только в том случае, если у больных индивидов обнаружены мутации в этом гене, не встречающиеся у здоровых людей. В большинстве случаев продукт главного гена играет ключевую роль в патогенетических механизмах формирования патологических симптомов заболевания. В качестве примера можно привести значительный вклад двух генов *BRCA1* и *BRCA2* в предрасположенность к семейным формам рака молочной железы (см. рис. 24.2). Существование «эффекта главного гена» позволяет использовать классический параметрический подход для анализа сцепления выбранных генов-кандидатов при картировании генов предрасположенности к заболеваниям. С помощью модели главного гена в группе мультифакториальных заболеваний удалось выделить формы, имеющие моногенное наследование. Так, в обширной группе гиперлипидемий, приводящих к ишемической болезни сердца (ИБС), была выделена семейная гипехолестеролемия, обусловленная мутацией в гене рецептора липопротеинов низкой плотности (см. разд. 23.4), в группе эссенциальной гипертензии идентифицировано 4 моногенных варианта, а при инсулинонезависимом сахарном диабете обнаружено 6 генетических вариантов взрослой формы заболевания у молодых (MODY – 1–6 типов). Клинико-генетические характеристики моногенных форм этих групп широко распространенных заболеваний представлены в табл. 24.1.

Идентификация генов, вносящих вклад в генетическую предрасположенность к БНП, достаточно сложная задача. Основные причины этого следующие: 1) отсутствие менделевского типа наследования у большинства заболеваний этой группы; 2) наличие у них выраженной генетической гетерогенности (каждая клиническая форма представляет собой группу наследственных дефектов с одинаковым проявлением); 3) недостаточная изученность патогенетических механизмов.

В настоящее время для идентификации генов предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям используют три основных метода: 1) анализ ассоциации заболевания с полиморфными маркерами; 2) анализ сцепления заболевания с полиморфными маркерными генами; 3) экспериментальное скрещивание животных.

24.3.1. АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ БНП С ПОЛИМОРФНЫМИ МАРКЕРАМИ

В основе этого метода лежит сравнительный анализ частоты встречаемости определенного полиморфного маркера у больных и в контрольной выборке здоровых индивидов из той же популяции. В качестве полиморфных маркеров при изучении их ассоциаций с мультифакториальными заболеваниями используются генетические маркеры (определенные аллели гена) и антигены главного комплекса гистосовместимости, или HLA-комплекса (*human leucocyte antigens*).

HLA-комплекс представлен поверхностными антигенами, локализованными на мембране всех ядросодержащих клеток, кроме эритроцитов. Его нормальное функционирование имеет решающее значение в формировании иммунного ответа организма на введение чужеродных агентов и контроле клеточных взаимодействий. Компоненты этого комплекса кодируются супергенным семейством, расположенным на хромосоме 6p21.3 внутри 4.2 Mb региона, и поделены на три класса. Наибольшее значение для формирования иммунного ответа имеют 15 генов 1-го класса и 23 гена 2-го класса, представленные, в свою очередь, несколькими сотнями аллелей. Существует три изоформы HLA 1-го и 2-го классов. В первом классе выделяют HLA-A, HLA-B, HLA-C, во втором – HLA-DR,HLA-DQ.

Наиболее четкие ассоциации с антигенами различных классов HLA-комплекса были выявлены для аутоиммунных и инфекционных заболеваний, в патогенезе которых ведущее значение имеют иммунологические реакции. Возможно, что гены комплекса гистосовместимости могут быть одними из генов (или даже главными генами), формирующими генетическую компоненту этих мультифакториальных заболеваний. В некоторых случаях (например, при ревматоидном артрите) ассоциации настолько достоверны, что часто рассматриваются как маркеры заболевания и имеют диагностическое и дифференциально-диагностическое значение. В табл. 24.2. представлены заболевания, для которых выявлена наиболее значимая ассоциация с антигенами HLA-комплекса.

Изучение ассоциаций мультифакториальных заболеваний с определенными генами основано на предположении о том, что если тот или иной ген участвует в формировании предрасположенности к мультифакториальному заболеванию, какой-то

Таблица 24.2. **Риск развития некоторых мультифакториальных заболеваний при наличии антигенов HLA-комплекса**

Заболевание	HLA	Риск заболевания (в %)
Анкилозирующий спондилит	B27	90
Псориатический спондилит	B27	12
Гемохроматоз	A3	8
Синдром Рейтера	B27	36
Псориаз	CW6	13
Ревматоидный артрит	DR4	6
Болезнь Аддисона	DR3	6
Гнездная аллопеция	DQW7	6
Рассеянный склероз	DR B1	6
Инсулинзависимый диабет	DR3	6
	DR4	6

из его аллелей должен обнаруживаться у больных значительно чаще, чем в популяции. Частота встречаемости других аллелей этого гена у больных должна быть ниже, чем в популяции. В большинстве случаев в качестве тестируемого маркера выбирают аллели таких генов, продукты которых могут участвовать в патогенезе заболевания. При обнаружении увеличенной частоты встречаемости исследуемого маркера у больных по сравнению с контролем можно сделать заключение о существовании его ассоциации с заболеванием. Такая ассоциация может иметь две основные причины: 1) исследуемый генетический маркер может быть одним из генов, определяющих предрасположенность к заболеванию, а его продукт – существенным звеном патогенеза заболевания и 2) существует неравновесие по сцеплению между геном, мутации в котором приводят к развитию заболевания, и маркерным локусом.

Наибольшей эффективности при изучении ассоциаций и выявлении генов предрасположенности к БНП можно добиться при исследовании ядерных семей с различными типами браков родителей (тест на неравномерность передачи аллелей Шпильмена). Исследование проводится в парах родитель-больной ребенок. В этом случае формируются две выборки семей (первую выборку составляют семьи, где оба родителя здоровы, а ребенок болен, а вторую – семьи, где болен один из родителей и ребенок). Дальнейший анализ направлен на сравнение частот встречаемости двух групп аллелей: 1) аллелей здоровых родителей, не передавшихся больным детям и 2) аллелей, обнаруженных у больных. Если существует несколько различных аллелей гена, то при использовании этого метода можно выявить предпочтительную передачу одного из них от больного или гетерозиготного родителя больному ребенку. Контрольную выборку будут составлять аллели здоровых родителей, которые не встречаются у больных детей. Так в случае родословной, представленной на рис. 24.3, *а* аллели A_2 и A_4, не передавшиеся больному потомку, составят группу контроля, а в случае родословной, представленной на рис. 24.3, *б* – в контрольную выборку войдет лишь аллель A_4. Так как данный метод поиска ассоциаций предполагает использование ядерных семей, родительские аллели, не сцепленные с геном или генами болезни, будут всегда сегрегировать независимо от аллелей гена предраспо-

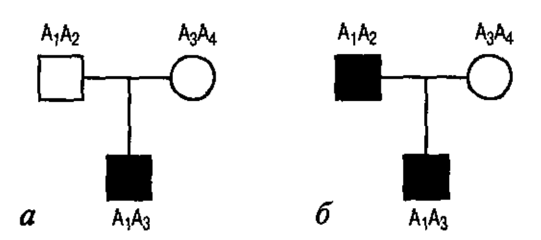


Рис. 24.3. Ядерные семьи с различными типами браков

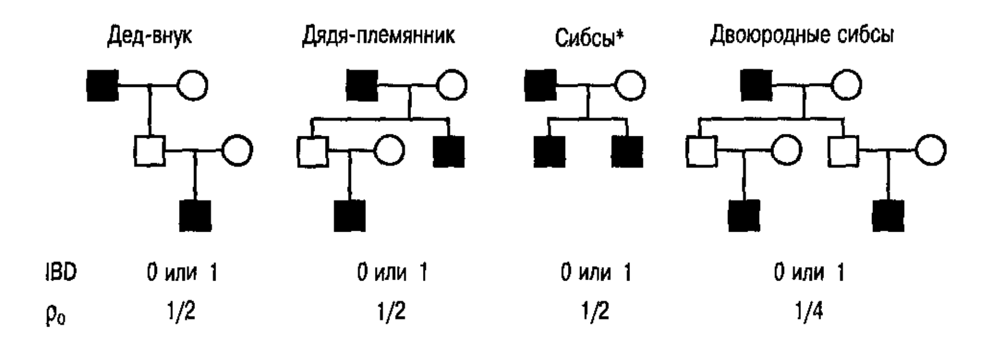


Рис. 24.4. Анализ сегрегации идентичных аллелей в различных парах родственников. *Сибсы – рассматриваются как две полусибсовые пары

ложенности к болезни, т.е. при применении данного метода выявляются ассоциации только для маркеров, физически сцепленных с локусом болезни.

Изучение ассоциаций полиморфных маркеров с заболеванием очень перспективно в популяциях с высоким уровнем инбридинга. В таких популяциях все члены являются в той или иной степени родственниками, т.е. имеют определенную долю общих генов (унаследованную от общего предка).

Среди непараметрических методов анализа ассоциаций наиболее широко применяется **метод идентичных по происхождению аллелей** (метод IBD – от англ. *identical by descent*). Этот метод основан на анализе частот встречаемости одного и того же аллеля в различных парах родственников. Выясняется, насколько чаще в различных парах родственников обнаруживаются общие аллели по сравнению с их случайной сегрегацией на основе менделевских закономерностей. При проведении такого рода исследований возможны анализ сегрегации идентичных аллелей в различных парах

родственников (сибсы, дядя-племянник, дед внук и т.д.) и сравнение наблюдаем долей идентичных по происхождению аллелей в каждом локусе с ожидаемым в со ветствии с менделевским типом наследования. На рис. 24.4. представлены приме родословных, с указанием вероятности иметь идентичный аллель при наличии сцепления с заболеванием (IBD) и при менделевской сегрегации (ρ_0).

Если идентичный по происхождению аллель сцеплен с заболеванием, то част его встречаемости в парах пораженных родственников будет статистически значи превышать ожидаемую при отсутствии сцепления. В этом случае значимость от чий оценивается методом χ-квадрат.

24.3.2. АНАЛИЗ СЦЕПЛЕНИЯ БНП С ПОЛИМОРФНЫМИ МАРКЕРАМИ

Одним из наиболее перспективных подходов к идентификации генов предраспо женности к БНП в настоящее время считают анализ сцепления заболевания с по морфными ДНК-маркерами (гл. 18). Для анализа используют от 300 до 500 так маркеров, распределенных по всему геному. В последние годы для выявления сц ления мультифакториальных заболеваний с определенным геном все чаще приме ют метод полногеномного скрининга. Однако до настоящего времени ни для одн мультифакториального заболевания не удалось идентифицировать все гены.

24.4. МЕТОД ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СКРЕЩИВАНИЯ МОДЕЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Полезная информация о локализации генов мультифакториальных заболеваний м жет быть получена и при скрещивании модельных животных, принадлежащих одн генетической линии. Использование этого метода позволяет исключить влияние нетической гетерогенности изучаемого заболевания и контролировать дейст внешнесредовых факторов. Благодаря большому количеству потомков и высок скорости размножения экспериментальных животных при их скрещивании удае картировать локусы количественных признаков, связанных с определенными ви ми наследственной патологии. К ограничениям этого метода следует отнести нев можность прямой экстраполяции результатов, полученных на животных, к челове В этом случае проводится анализ сходства генетических механизмов аналогичн патологии или гомологичных участков генома человека и экспериментального ж вотного.

24.5. КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НЕКОТОРЫХ БОЛЕЗНЕЙ С НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ

К настоящему времени картировано множество локусов, обнаруживающих сцепление с рядом широко распространенных БНП, таких как бронхиальная астма, атеросклероз, эссенциальная гипертензия и некоторых других. Однако до настоящего времени ни при одном мультифакториальном заболевании не удалось выявить все гены, участвующие в формировании генетической предрасположенности. Это связано с существованием сложной цепи патогенеза болезней с наследственной предрасположенностью, нарушение различных звеньев которой обусловливает генетическую гетерогенность отдельных нозологических форм. Таким образом, с генетической точки зрения каждая клиническая форма представляет собой группу наследственных дефектов с одинаковым клиническим проявлением. В свою очередь генетическая гетерогенность обусловливает различия в комбинации и тяжести клинических проявлений БНП.

Рассмотрим клинико-генетические характеристики ряда распространенных заболеваний с наследственной предрасположенностью.

Болезнь Альцгеймера – наиболее частое нейродегенеративное заболевание пожилого возраста, приводящее к деменции у взрослых. Показано, что этим заболеванием страдают около 20 млн. человек и количество больных продолжает увеличиваться. Среди основных клинических проявлений болезни Альцгеймера – прогрессирующее слабоумие, характеризующееся резким снижением памяти, расстройствами речи, письма, праксиса, ориентировки в пространстве; эпилептические приступы и экстрапирамидные расстройства. С течением времени у больного возникает полный распад личности и выраженное физическое истощенне. Изучение клинических характеристик заболевания позволило выделить две его основные формы – с ранним и поздним началом. При раннем варианте симптомы появляются в возрастном интервале 40–58 лет, а при позднем – в возрасте 58–80 лет. Дальнейшие исследования показали, что существуют семейные формы болезни Альцгеймера, при которых в семье диагностировано, по крайней мере, два случая заболевания, и спорадические. Семейное накопление наиболее часто выявляется в группе болезни с ранним началом, на которую и было обращено основное внимание при проведении генетических исследований. Использование генеалогических данных и различных методов ДНК-анализа (прежде всего, изучение сцепления с полиморфными ДНК-маркерами) позволило: во-первых, выявить генетическую гетерогенность этой группы болезни Альцгеймера, характеризующейся существованием нескольких полилокусных вариантов, и установить аутосомно-доминантный тип их наследования а, во-вторых, идентифицировать три гена, мутации в которых приводят к возникновению трех моногенных форм болезни. Одни из этих генов *APP* (от англ. *amyloid precuros*

protein), локализован на хромосоме 21q21 и кодирует предшественник β-амилоида, участвующий в формировании амилоидных бляшек в веществе мозга. Два других гена, локализованные на хромосомах 14q24.3 и 1q31-42 соответственно, кодируют мембранные белки пресенилины, экспрессируются исключительно в нейронах и обеспечивают регуляцию транспорта ряда мембранных белков, в том числе и предшественника β-амилоида. Нарушение этого процесса приводит к избыточной продукции данного белка, а также к усилению интенсивности апоптоза нейронов. В ряде семей с аутосомно-доминантной сегрегацией болезни Альцгеймера не выявлено мутаций в трех перечисленных генах, что предполагает существование большей генетической гетерогенности этого заболевания, вероятно не ограниченной тремя указанными генетическими вариантами. Кроме того, установлено, что лишь в 23—30% всех случаев болезнь Альцгеймера является семейной, гораздо чаще заболевание носит спорадический характер и имеет мультифакториальную природу. К таким вариантам относится подавляющее число случаев заболевания с поздним началом. Для изучения генетических механизмов этой группы болезни Альцгеймера были использованы методы анализа ассоциаций с различными аллелями генов, продукты которых могут участвовать в патогенезе заболевания. Основное внимание было обращено на поиск ассоциаций заболевания с аллелями генов, имеющих отношение к формированию амилоидных бляшек. Благодаря этим исследованиям была доказана ассоциация болезни Альцгеймера с одним из аллелей гена аполипопротеина Е (*apo-E*), локализованного на хромосоме 19q13.2 и имеющего три основных аллеля. Установлено, что кодируемые этим геном изоформы белка, специфически связываются с β-амилоидом. При проведении сравнительного анализа частоты встречаемости трех аллелей гена у родственников больных и в контрольной популяции показано, что один из этих аллелей — ε4 достоверно чаще встречается у больных с поздней формой болезни Альцгеймера, чем в контрольной группе. Частота этого аллеля у больных составляла 50%, в то время как у здоровых людей из группы контроля она не превышала 15%, что позволило высказать предположение о значительном вкладе этого аллеля в формирование генетической предрасположенности к заболеванию. Показано также, что риск развития болезни Альцгеймера напрямую связан с дозой этого аллеля и значительно выше у гомозигот по сравнению с гетерозиготами по этому аллелю. Полученные результаты явились основой для проведения тестирования на наличие генетической предрасположенности к болезни Альцгеймера. Безусловно, обнаружение одного или двух аллелей ε4 гена *apo-E* не позволяет однозначно прогнозировать развитие заболевания. Это связано с одной стороны с тем, что только половина всех больных с болезнью Альцгеймера имеет этот аллель, а с другой – с тем, что у 15% людей, имеющих этот аллель, заболевание не развивается, что подтверждает мультифакториальную природу болезни. Таким образом, ген *apo-E* является существенным, но не единственным фактором генетической предрасположенности к болезни Альцгеймера. Необходимы дальнейшие исследования, направленные на идентификацию всех генов предрасположенности, формирующих сложную патогенетическую цепь заболевания. Представленный пример демонстрирует всю сложность изучения и оценки риска развития мультифакториальных заболеваний. Риск развития заболевания у носителей определенных генотипов, даже после выявления достаточно тесных ассоциаций с определенным аллелем того или иного гена, не является стопроцентным и зависит от ряда других генетических и средовых факторов.

Эссенциальная гипертензия (ЭГ) – *гетерогенная группа заболеваний, основным* клиническим проявлением которых является повышение уровня артериального давления и связанные с этим осложнения (инфаркты, инсульты, почечная недостаточность). К настоящему времени известно более 100 генов, продукты которых могут прямо или косвенно участвовать в сложном патогенезе различных форм ЭГ. Прежде всего, это компоненты ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем; продукты, обеспечивающие поддержание сосудистого тонуса (эндотелины, синтазы закиси азота, компоненты кальциевых каналов) и структуры сосудов (эластин, фибриллин, коллаген-связывающий белок); рецепторы адренергической системы (например, дофамина); продукты метаболизма стероидных гормонов (11-β-гидроксилазы, 17-α-гидроксилазы и др.) и водно-солевого гомеостаза (аквапорины, рецепторы вазопрессинов, ионные каналы). Однако изучение полиморфизма соответствующих генов, не выявило особенно значимых ассоциаций некоторых из них с различными клиническими вариантами эссенциальной гипертензии. Основные гены-кандидаты, участвующие в предрасположенности к ЭГ, представлены в табл. 24.3.

Показано, что ряд генов, формирующих предрасположенность к эссенциальной гипертензии, вносят вклад в этиологию другого широко распространенного заболевания – **атеросклероза**. Это связано со сходством ряда патогенетических механизмов данных заболеваний, в частности обусловленных нарушением функционирования ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем. Однако ведущее значение в патогенезе атеросклероза отводится повышению концентрации липидов в плазме крови, нарушению процессов свертывания крови и целостности сосудистой стенки. В связи с этим в качестве основных генов кандидатов рассматриваются гены, продукты которых обеспечивают липидный обмен. Значимое сцепление заболевания обнаружено с рядом локусов: *CEPT* (транспортного белка эфиров холестерола на хромосоме 16), с кластером *apoA1/apoC3/apoA4* на хромосоме 11.

При другом распространенном мультифакториальном заболевании – **бронхиальной астме** – также выявлено значительное число локусов, сцепленных с болезнью в различных семьях, локализованы гены-кандидаты, продукты которых могут участвовать в трех основных звеньях патогенеза заболевания: иммунологическом , воспа-

Таблица 24.3. **Кандидатные гены предрасположенности к эссенциальной гипертензии**

№	Ген	Локализация	OMIM
1	*SCNN 1B* (1-β-субъединица эпителиального Na^+ канала)	16p13-p12	600760
2	*SCNN 1G* (1-γ-субъединица эпителиального Na^+ канала)	16p13-p12	600761
3	*APNH* (Na^+/H^+-антипортер)	1P36.1-p35	107310
4	*REN* (ренин)	1q25-q32	179820
5	*AGT* (ангиотензин I)	1q42-q43	106150
6	*AGE* (ангиотензин I конвертирующий фермент)	17q22-q24	106180
7	*PLA2* (панкреатическая фосфолипаза А2)	12q23-q24.1	172410
8	*SAH* (гипертензия, обусловленная геном, экспрессирующимся в почке)	16p13.11	145505
9	*NOS 3* (эндотелиальная синтаза окиси азота)	7q35-q36	163729

лительном и нейрогенном. Особое внимание уделяется генам семейства интерлейкинов, цитокинов и цитокиновых рецепторов, обеспечивающих нормальное функционирование слизистой бронхов и тучных клеток, контролирующих уровень IgE в крови и детоксикацию ксенобиотиков. Учитывая значительную роль нарушений функционирования иммунной системы при различных формах бронхиальной астмы и других вариантах атопий, по-прежнему большое значение придается выявлению ассоциаций этих заболеваний с главным комплексом гистосовместимости (HLA). Наиболее вероятными кандидатами на роль «главного гена» предрасположенности к бронхиальной астме являются гены интерлейкина-9 и интерлейкина-4, картированные на хромосоме 5q31-q33. Наряду с этим показано, что при ряде вариантов бронхиальной астмы, начинающихся в детском возрасте и сопровождающихся увеличением концентрации в крови IgE, обнаруживается значимая ассоциация с локусом хромосомы 20p13, где локализован ген мембран-ассоциированного белка клеточного сурфактанта из семейства цитокинов/цитокиновых рецепторов. Предполагается, что помимо двух указанных генов в формировании генетической предрасположенности к этому заболеванию значительную роль играют еще несколько генов, локализованных в хромосомных регионах – 6p21.3 – p21.1(*TNFA*), 11q12–q13(*IGEL* и *FCER1b*), 12q15–q24.1 (*IGIF* и *NOS1*), 13q14.2–q14.3 (*ESD*). Продуктами этих генов являются: β-фактор некроза опухолей, белок, регулирующий уровень общего IgE, α-иммунноглобулиновый рецептор тучных клеток, γ-интеферон, невральная синтетаза окиси азота и эстераза D, соответственно.

Выявлен ряд генов, обнаруживающих сцепление с другими распространенными мультифакториальными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит, рассеянный склероз, остеопороз, ожирение, эндометриоз и др. Однако, несмотря на успехи в поиске ассоциаций и сцепления с определенными локусами генов, в настоящее время ни для одного заболевания с наследственным предрасположением невозможно выделить спектр генов для скрининга на предрасположенность. Это обусловлено *рядом причин*: выраженной генетической гетерогенностью БНП, различиями механизмов генетической предрасположенности при семейных и спорадических случаях, различиями в частоте встречаемости аллелей генов предрасположенности между популяциями, а также сравнительно небольшим вкладом в патогенез заболевания продуктов ассоциированных с заболеванием генов. Таким образом, ни использование математических моделей наследования мультифакториальных заболеваний, ни методы ДНК-анализа пока не позволяют получить адекватные цифры повторного риска возникновения заболевания у родственников пораженных пробандов, которые можно было бы использовать для всех семей из различных популяций.

24.6. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Одна из наиболее распространенных групп мультифакториальных заболеваний – злокачественные новообразования. Их распространенность у детей составляет 1:1660, а среди лиц среднего и старшего возраста этот показатель увеличивается до 1:10.

Генетические аспекты этиологии и патогенеза злокачественных новообразований у человека изучаются очень давно. Первым предположил роль наследственности, как одного из механизмов канцерогенеза, французский хирург Брока, описавший в 1869 г. родословную семьи своей жены, где из 24 женщин 10 умерли от рака молочной железы.

Как и для всех мультифакториальных заболеваний реализация механизмов канцерогенеза обеспечивается совместным действием целого ряда генетических и средовых факторов.

Основными генетическими механизмами, запускающими процесс канцерогенеза, у человека являются мутации генов двух групп семейств, контролирующих процессы жизнеобеспечения клетки: протоонкогенов и антионкогенов (генов-супрессоров опухолевого роста).

Протоонкогены представляют собой группу семейств генов, которые играют ключевую роль в пролиферации и дифференцировке клеток, функционировании клеточных рецепторов, репарации ДНК и формировании ответа на внешние регуляторные сигналы. Продукты этих генов в норме регулируют многостадийный процесс сигнальной трансдукции. Передача сигналов опосредована тремя механизмами:

1) фосфорилированием серина, треонина и тирозина в остатках белков путем отщепления фосфатной группы от АТР, в результате чего изменяется конфигурация белка-фермента и его активность;

2) регуляцией активности GTPазы, осуществляющей GDP/GTP-превращение и выполняющей роль молекулярного медиатора мембрано-ассоциированных тирозин-киназы и серин-треонин-киназы;

3) регуляцией репликации ДНК, экспрессии ядерных генов и процессов апоптоза.

Гены-супрессоры опухолевого роста в норме отвечают за подавление клеточной пролиферации на определенных стадиях онтогенеза, т.е. регулируют (тормозят) экспрессию протоонкогенов.

Трансформация нормальной клетки в опухолевую представляет собой длинную цепь событий, инициируемых каскадом мутаций в протоонкогенах и генах-супрессорах. Механизмы канцерогенеза, запускаемые мутациями в генах этих двух групп семейств, несколько различаются.

Мутации в протоонкогенах, обусловливающие их трансформацию в так называемые клеточные (целлюлярные) онкогены (*c-onc*), могут 1) затрагивать структурную часть гена и приводить к изменению его продукта или 2) повышать уровень экспрессии гена за счет хромосомных перестроек и/или мутаций в регуляторной части (в области промотора или энхансера) или амплификации (увеличения числа копий).

Мутации в структурной части гена – это, как правило, точковые мутации, меняющие конфигурацию белка, в результате чего активируется аутофосфорилирование, увеличивается активность фермента и, следовательно, усиливается клеточный рост. Эти мутации аутосомно-доминантные, так как для злокачественной трансформации клетки не нужен второй сопутствующий онкоген. Такие мутации описаны для семейства протоонкогенов *ras*: так в гене *c-Ha-ras* в кодоне, соответствующем 12-й аминокислоте белка p21ras, замена G → T (в белке – замена глицина на валин) приводит к развитию карциномы мочевого пузыря; точковая мутация в гене *c-N-ras*, приводящая к замене лизина на глицин в 61-м положении белка p21ras, обусловли-

вает развитие меланом и ряда карцином; активация протонкогена *c-Ki-ras2* вследствие двух различных точковых мутаций в одном и том же кодоне, соответствующем 12-й аминокислоте белка p21ras (замена глицина на валин или цистеин), приводит к развитию острого миелоидного лейкоза или карциномы щитовидной железы, соответственно. Точковые мутации выявлены и в гене *erbA*: замена ряда аминокислот в аминотерминальных положениях на валин в белке P75erb приводит к развитию эритробластозов.

При анализе кариотипа больных с различными типами опухолей часто выявляются транслокации, делеции и инсерции. В результате этих хромосомных перестроек протоонкоген может попасть в зону действия активного промотора, при этом транскрипция протоонкогена увеличится. Так протоонкогены *c-mos*, *c-myc* и *c-abl* активируются вследствие транслокаций t(8;21), t(8;14), t(9;22), соответственно, что приводит к развитию следующих опухолей: острого миелоидного лейкоза, лимфомы Беркитта, хронического миелоидного лейкоза. Делеции 11p рядом с областью расположения гена *c-ras* — 11p13, могут привести к развитию аниридии или опухоли Вилмса. Результатом транслокации может быть и амплификация гена (см. ниже), например, амплификация протонкогена *abl* при хроническом миелолейкозе.

Предполагается, что инсерции в регуляторные участки гена представлены преимущественно последовательностями генома некоторых ДНК-содержащих вирусов или провирусной ДНК ретровирусов (РНК-содержащие). Встраивание в определенные участки генома регуляторных ДНК-последовательностей ретровирусов и/или активация провирусами промоторов клеточных онкогенов может привести к резкому усилению экспрессии протоонкогенов и развитию опухоли.

Возникновение опухолей, ассоциированных с ДНК-содержащими вирусами, обусловлено тем, что вирусная ДНК становится частью клеточного генома и вместе с ним передается дочерним клеткам. При этом репликация и экспрессия вирусной ДНК частично или полностью регулируются клеточными механизмами, в зависимости от степени интеграции генома вируса. Механизм регуляции экспрессии интегрированного генома вируса зависит от вида клеток. Некоторые типы ДНК-вирусов и обусловленные ими опухоли представлены в табл. 24.4.

У большинства протоонкогенов человека выявлено некоторое сходство с нуклеотидной последовательностью дополнительных генов ретровирусов, обладающих онкогенным эффектом при внедрении в клетку-хозяина (вирусные онкогены — *v-onc*). Предполагают, что онкогены ретровирусов имеют клеточную природу и возникли вследствие рекомбинации провирусной ДНК с генами, регулировавшими процессы делеиия, дифференцировки и метаболизма клетки. Становясь вирусными (лишенными интронов), эти гены «уходят» от клеточного контроля регуляции экспрессии, постоянно функционируют и амплифицируются. Следствием этих событий является их повышенная экспрессия, приводящая к трансформации нормальной клетки в опухолевую. Гомология протоонкогенов с провирусными ДНК-последовательностями ретровирусов объясняет роль вирусов в некоторых возможных механизмах злокачественного перерождения клеток. При рекомбинации и внедрении в геном вируса последовательности, соответствующей протоонкогену, вследствие высокого уровня мутирования ретровирусов, вероятность трансформации протоонкогена в онкоген возрастает. Далее процесс трансформации клетки может идти двумя путями: либо

Таблица 24.4. **ДНК-содержащие вирусы человека, приводящие к развитию опухолей**

Семейство вирусов	Тип вируса	Тип опухоли
Herpes	Вирус Эпштейна–Барр (EBV)	Лимфома Беркита, назофарингеальная карцинома, лимфомы иммунных конфликтов хозяев
	Вирус герпеса, ассоциированный с саркомой Капоши (KSAHV)	Саркома Капоши
	Лимфотропный вирус Т-клеток человека, тип 1 (HTLV1)	Т-клеточный лейкоз
Hepadna	Вирус гепатита В (HBV)	Печеночно-клеточная карцинома
Papova	Вирус папилломы человека (HPV)	Бородавки (подошвенные и генитальные). Урогенитальные раки (шейки матки, вульвы, клитора), рак кожи

Таблица 24.5. **Происхождение некоторых протоонкогенов и формирование их названий**

Онкоген (протоонкоген)	Индуцируемая опухоль	Название вируса	Инфицируемый вид
src	Саркома	Rous sarcoma	Курица
erb-B	Эритробластный лейкоз	Avian erythroblastosis	Курица
myb	Миелобластный лейкоз	Avian myeloblastosis	Курица
myc	Миелоцитома, саркома	Avian myelocytomatosis	Курица
abl	В-клеточный лейкоз	Abelson leukaemia	Мышь
Fos	Остеосаркома	FBJ murine osteosarcoma	Мышь
Mos	Саркома	Moloney murine sarcoma	Мышь
Ha-ras	Саркома	Harvey murine sarcoma	Крыса (Rat)
Ki-ras	Саркома	Kirsten murine sarcoma	Крыса (Rat)
Sis	Саркома	Simian sarcoma	Обезьяна

при последующей рекомбинации происходит обратное встраивание онкогена в клетку и экспрессия измененного белка, либо увеличение дозы аномального гена путем амплификации.

Гомология протоонкогенов и вирусных онкогенов лежит в основе и их обозначения. Для этого используется аббревиатура, состоящая из первых букв названия вируса, в котором впервые был обнаружен данный ген, а иногда индуцируемой им опухоли и поражаемого вида (табл. 24.5.).

Механизм амплификации гена имеется и в норме, так как необходим для защиты клетки от стрессовых ситуаций. Например, резистентность опухолевых клеток к химиотерапии метатрексатом при миелоидном лейкозе обусловлена амплификацией гена дигидрофолат-редуктазы – фермента, блокируемого этим препаратом.

Наиболее часто наблюдается амплификация протоонкогенов *myc*-семейства. Этот механизм активации протоонкогена обнаружен при таких опухолях как нейробластома, около половины случаев которой обусловлено амплификацией гена *N*-

myc, и мелкоклеточная карцинома легких, возникающая вследствие амплификации генов *c-myc*; *N-myc* и *L-myc*.

Амплификация гена может быть выявлена в виде малых добавочных хромосом, известных как минихромосомы, гомологичные соответствующим участкам хромосом. Увеличение числа копий некоторых протоонкогенов, например, *N-myc* при нейробластомах, характерно для поздних стадий малигнизации (озлокачествления) и предположительно может служить тестом для определения стадии развития рака и прогноза течения заболевания.

Повышение экспрессии протоонкогена возможно и вследствие других механизмов, приводящих к эффекту дозы гена. Так усиление транскрипции гена может быть обусловлено эпигеномными изменениями: снижением/отсутствием действия специфического репрессора и гиперметилированием.

Функционально-генетические характеристики протоонкогенов, мутации в которых приводят к развитию злокачественных опухолей человека, представлены в табл. 24.6.

Мутации в протоонкогенах в большинстве случаев возникают в соматических клетках под действием мутагенных факторов внешней среды, в качестве которых наиболее часто выступают промышленные и сельскохозяйственные яды, табачный дым, вирусы. В связи с этим мутации, возникшие именно в генах семейств протоонкогенов, обусловливают развитие большинства распространенных злокачественных новообразований у взрослых. В ряде случаев роль дополнительных провоцирующих факторов играют генные дефекты, приводящие к увеличению частоты хромосомных аберраций (предрасполагающих к развитию опухолей). В качестве примера можно привести рецессивные болезни, обусловленные нарушением процессов репарации, таких как пигментная ксеродерма, атаксия-телеангиэктазия Луи–Бар, синдром Блума.

Принципиально другой патогенетический механизм наблюдается при возникновении мутаций в генах-супрессорах опухолей или антионкогенах. В этом случае для перехода нормальной клетки в злокачественную необходимы два последовательных мутационных события. Такую двухаллельную модель канцерогенеза предложили в 1972 г. Кнудсен и Стронг. Этот процесс носит название **гомозиготизации** или потери гетерозиготности. Гены-супрессоры опухолевого роста наследуются аутосомно-доминантно и при гетерозиготном состоянии аллеля (Аа) развитие опухоли не наблюдается. Механизмы канцерогенеза реализуются лишь в гомозиготных или гемизиготных по мутантному аллелю клетках.

В большинстве случаев индивид наследует мутантный аллель супрессорного гена опухоли от одного из родителей, для возникновения заболевания необходимо возникновение мутации во втором аллеле гена в соматической клетке. Наличие одного мутантного аллеля делает клетку более чувствительной к воздействию различных мутагенных факторов, под влиянием которых и возникает вторая мутация, приводящая к опухолевой трансформации клетки. Тот же механизм действует в случае, если оба родителя здоровы, а доминантная мутация, унаследованная ребенком, возникла в герминативной клетке de novo.

Потеря конституциональной гетерозиготности может возникать в результате следующих событий: 1) потери одного из гомологов вследствие нерасхождения хромо-

Таблица 24.6. **Генетические характеристики злокачественных новообразований человека, возникающих в результате активации протоонкогена**

Классы протоонкогенов и онкогенов	Локализация гена	Функции протоонкогена	Типы нарушений генетического материала	Типы и локализация опухолей
ФАКТОРЫ РОСТА				
v-sis	22q12-q13	β-цепь матрицы для синтеза фактора роста		Глиома/фибросаркома
int-2			Вирусная инсерция	Карцинома молочной железы
KS3			ДНК-трансфекция	Саркома Капоши
HST			ДНК-трансфекция	Карцинома желудка
int-1	12q14-qter		Вирусная инсерция	Карцинома молочной железы
РЕЦЕПТОРЫ ФАКТОРОВ РОСТА, ЗАВИСЯЩИЕ ОТ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ				
mas		Ангиотензиновый рецептор	ДНК-трансфекция	Карцинома молочной железы
Тирозиназо-зависимые интегральные мембранные белки, рецепторы факторов роста				
EGFR	7	Рецептор фактора роста эпидермиса	Амплификация	Сквамозно-клеточная саркома
v-fms	5q34	Рецептор фактора-1, стимулирующий рост колонии макрофагов		Саркома
v-rit		Фактор-R стволовых клеток		Саркома
v-ros		Тирозиназа	Хромосом. перестройка	Саркома
MET	7p11.4-7qter	Рецептор фактора роста гепатоцитов	Хромосом.перестройка	MNNG-леч.клеточная линия остеокарциномы человека
TRK		Тирозиназа	Точковая мутация	Карцинома толстой кишки
NEU		Рецептор фактора роста нервной ткани	Амплификация	Нейробластома
RET	10q11.2	Рецептор нейротропного фактора формирования глии		Карцинома щитовидной железыМножественная эндокринная неоплазия (MEN): типы 2A и 2B

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ФАКТОРЫ СИГНАЛЬНОЙ ТРАНСДУКЦИИ					
Мембранассоциированная тирозиназа	SRC	20	Тирозиназа		Карцинома толстой кишки
	v-yes		Тирозиназа		Саркома
	v-fgr		Тирозиназа		Саркома
	v-fps		Тирозиназа		Саркома
	v-fes	15q25-q26	Тирозиназа		Саркома
	BCR/ABL	22q11/9q34	Тирозиназа	Хромосом. транслокация	Хрон. миелоидный лейкоз
Мембранассоциированный G-белок	H-ras-1	11p15	GTPаза	Точковая мутация	Карцинома толстой кишки, легких, поджелудочной железы
	H-ras-2	X			
	K-ras-1	6p23-q12	GTPаза	Точковая мутация	Острый миелоидный лейкоз, карцинома щитовидной железы, меланома
	K-ras-2	12p12-pter			
	N-ras	1cen-p21	GTPаза	Точковая мутация	Карцинома, меланома
	Gsp	$G_6\alpha$		Точковая мутация	Карцинома щитовидной железы
	Gip	$G_1\alpha$		Точковая мутация	Карцинома яичника, надпочечника
Семейство белков, модифицирующих гуанин	Dbl	1p32?	для Rho и Cdc42Hs	Хромосом. перестройка	Диффузная В-клеточ. лимфома
	Ost		для RhoA и Cdc-42Hs		Остеосаркомы
	Tiam-1		для Rac и Cdc42Hs	Метастазы и онкогены	Т-клеточная лимфома
	Vay		для Ras?	Хромосом. перестройка	Клетки гематопоэза
	Lbc		для Rho	Онкогены	Миелоидные лейкозы
Цитоплазматическая серин/треонин киназа	v-mos	8q22	Серин/треонин киназа		Саркома
	v-raf	4	Серин/треонин киназа	Вирусная инсерция	Саркома
	pim-1		Серин/треонин киназа		Т-клеточная лимфома
	v-crk		Цитоплазматическая регуляция		SH-2/SH-3 адаптор
Семейство нуклеарных протеинов	v-myc	8q24?	Транскрипционный фактор		Миелоцитоматозная карцинома
	N-myc	2p23 pter	Транскрипционный фактор	Амплификация гена	Нейробластома,
	L-myc		Транскрипционный фактор	Амплификация гена	Карцинома легких
	v-myb	6q22-q24	Транскрипционный фактор		Миелобластоз
	v-fos	14q21-q31	Транскрипционный фактор API		Остеосаркома
	v-jun		Транскрипционный фактор API		Саркома
	v-ski	1q12-qter	Транскрипционный фактор		Карцинома
	v-rel	Ins(2;12)?	Мутантный NFкB	Ins(2;12)	Вариант лимфолейкоз
	v-ets	11q23-q24	Транскрипционный фактор		Миелобластоз
	v-erbA	17	Тиротропный рецептор	Точковая мутация	Эритробластоз

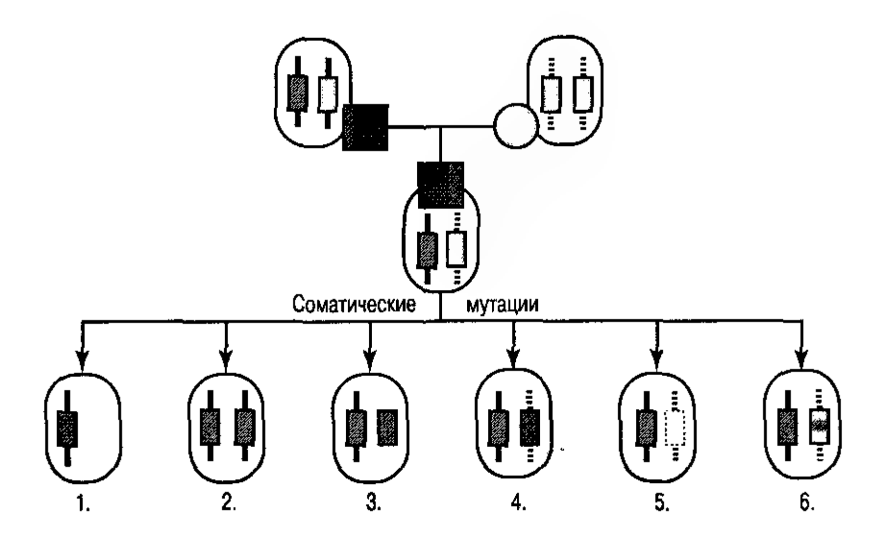


Рис. 24.5. Механизмы потери гетерозиготности (объяснение в тексте).

сом в митозе, 2) нерасхождения хромосом в митозе в сочетании с редупликацией, 3) митотической рекомбинации, 4) генной конверсии, 5) делеции в области генов-супрессоров, 6) точковых мутаций (рис. 24.5).

В настоящее время идентифицировано свыше 20 супрессорных генов, мутации в которых приводят к развитию опухолей. Наиболее частыми мутациями в генах-супрессорах опухолевого роста являются миссенс-мутации и точковые делеции в структурной части гена. Примеры некоторых генов-супрессоров и семейные формы злокачественных новообразований, которые возникают вследствие мутаций, приводящих к потере гетерозиготности по доминантному аллелю этих генов, представлены в табл. 24.7.

Необходимо отметить, что мутации в одном из генов семейств протоонкогенов или генов-супрессоров опухолевого роста – важный, но не единственный фактор развития злокачественной опухоли. Процесс малигнизации (озлокачествления) носит многоступенчатый характер: завершение каждого этапа служит стартом для следующего, т.е. последовательно включаются все гены, обусловливающие злокачественную трансформацию клеток. Этот многостадийный процесс можно рассмотреть на примере одного из механизмов развития рака прямой кишки (рис. 24.6). Вследствие потери гетерозиготности по гену *APC* происходит усиление клеточного роста (*аденоматозный полипоз*). При достижении размеров колонии аномальных клеток ⩾1 см усиливается деметилирование ДНК в клетках клона *(ранняя аденома)*, что приводит к активации протоонкогена *Ki-ras* и дальнейшему опухолевому росту. Потеря конституциональной гетерозиготности по гену *DCC* (от англ. *deleted in colorectal carcinoma*) приводит к еще более интенсивному размножению аномальных клеток (вследствие отсутствия еще одного этапа контроля клеточного роста) и формирова-

Таблица 24.7. Гены-супрессоры опухолей, злокачественные новообразования, возникающие при потере конституциональной гетерозиготности по этим генам, и синдромы, ассоциированные с опухолями

Ген	*Локализация гена*	*Наследственно обусловленные злокачественные новообразования и синдромы, ассоциированные с опухолями*
RB1	13q14	Ретинобластома (Retinoblastoma)
WT-1	11p13	Синдром WAGR (опухоль Вильмса (Wilm's tumor), аниридия и аномалии развития мочеполовой систем
TP53 (Tumor protein)	17p13	Синдром Ли-Фраумена Широко распространенные опухоли костей и внутренних органов (остеосаркома, рабдомиосарком рак молочной железы, мозга, коры надпочечников, прямой кишки, поджелудочной железы, карцинома почек, мочевого пузыря)
VHL	3p25-26	Синдром фон Хиппеля–Линдау (von Hippel–Lindau disease): гемангиобластома, рак почки, поджелудочн железы, феохромацитома
BRCA 1	17q21	Семейный рак молочной железы и яичников (Breast carcinoma, type I)
BRCA 2	13q12-13	Наследственный рак молочной железы и поджелудочной железы (Breast carcinoma, type II)
APC	5q21	Семейный аденоматозный полипоз (adenomatous po posis coli): рак прямой кишки, 12-перстной кишки, щитовидной железы, мозга
NF-1	17q12-22	Нейрофиброматоз I (болезнь Реклингаузена) (Neurofibromotosis I)
NF-2	22q	Нейрофиброматоз II (Neurofibromotosis II)
MEN-1	11q	Множественная эндокринная неоплазия, тип I (Multiple endocrine neoplasia, type I)
MSH2 *MLH1*	2p15-22 3p21.3	Наследственный неполипозный рак прямой кишки (MutS Homolog, Mut L Homolog)
CDH1	16q22.1	Рак желудка Cadherin

нию поздней аденомы. Когда опухоль достигает определенных размеров, кле расположенные в ее центре, начинают испытывать острую гипоксию. Это прив к мутации в гене *TP53* или к посттрансляционной модификации белка p53 с обр ванием его неактивной формы. В результате возникает непрограммируемый клеток вследствие нарушения апоптоза.

Локусы некоторых протоонкогенов и генов-супрессоров располагаются в принтинговых областях, вследствие чего механизмы развития опухолей и боле геномного импринтинга сходны. И те, и другие могут быть обусловлены одно тельской дисомией или нарушением процессов метилирования (гл. 22), что п

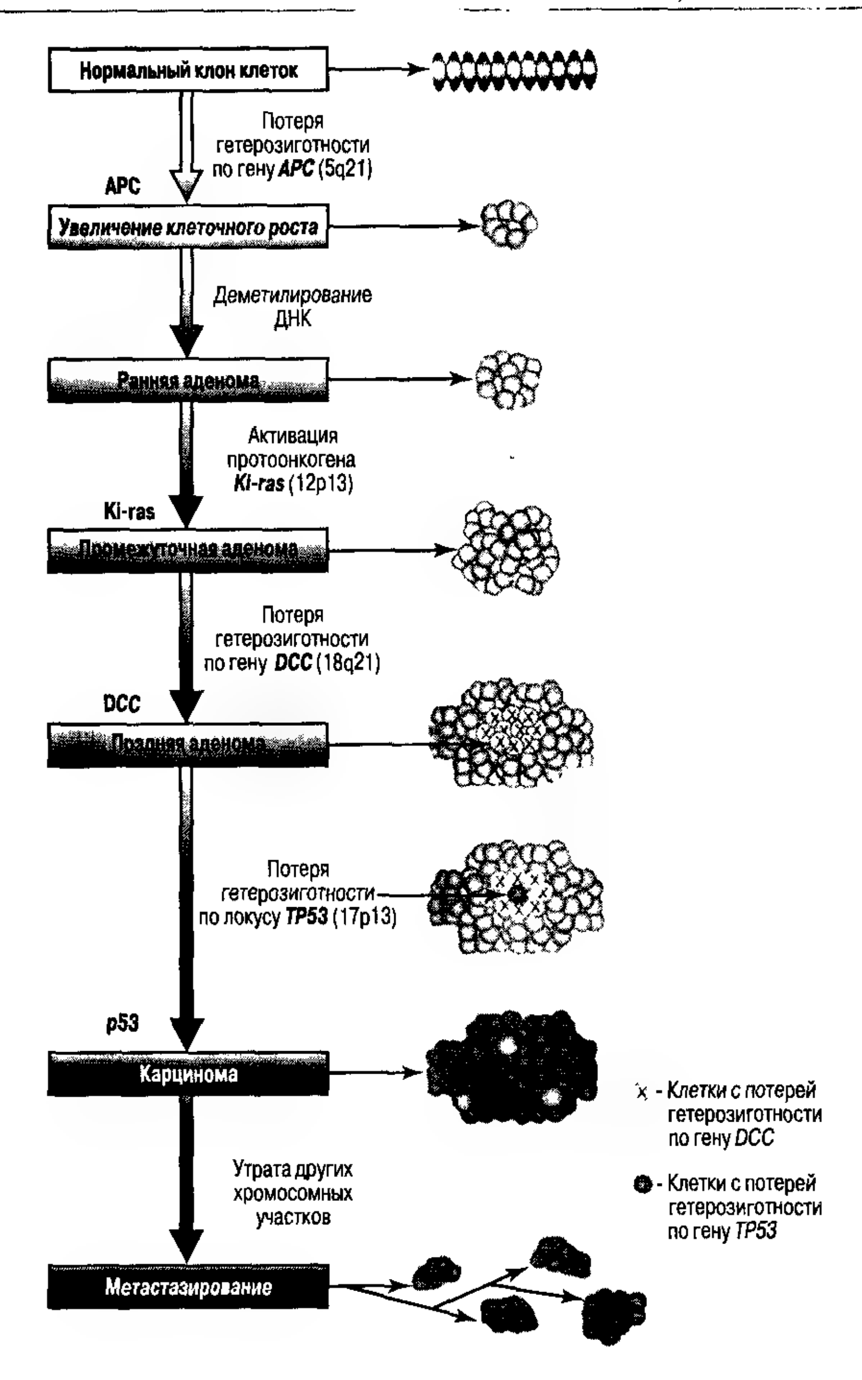


Рис. 24.6. Многостадийность процесса канцерогенеза на примере рака прямой кишки

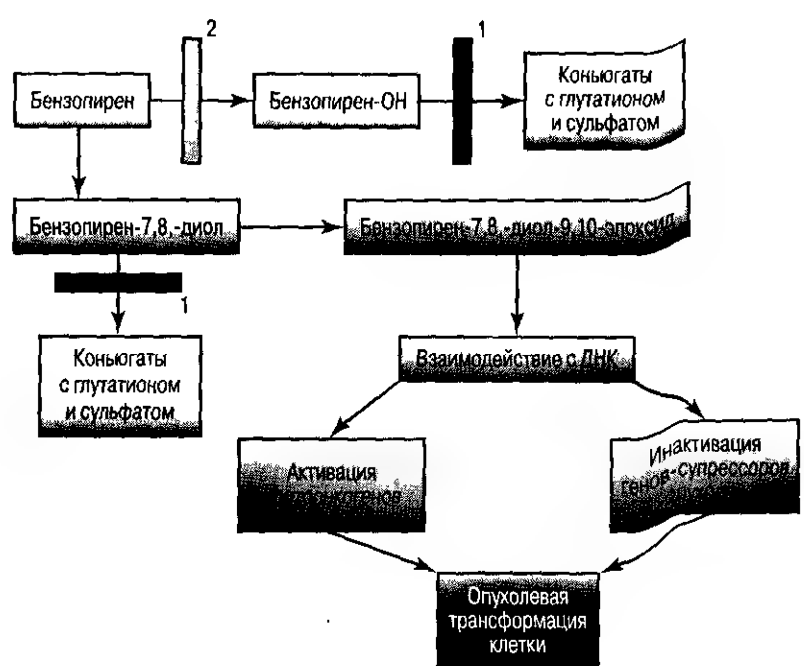


Рис. 24.7. Процесс формирования злокачественных новообразований при нарушении механизмов детоксикации бензопирена.

1 – нарушение (снижение) активности или недостаточность дезактивирующих ферментов: глутатион-трансфераз и сульфотрансфераз;

2 – повышение активности ферментов семейства цитохромов Р-450, гидроксилирующих/окисляющих ксенобиотик, переводя его в состояние, необходимое для дальнейшей его дезактивации

дит к наличию либо двух импринтированных генов-супрессоров либо двух активны аллелей протоонкогенов.

Кроме того, показано, что воздействие ряда мутагенных факторов внешней сре ды может приводить как к активации протоонкогенов, так и к инактивации генов супрессоров, т.е. обеспечивать реализацию обоих механизмов развития опухолей. качестве примера может служить возникновение рака легких при нарушениях би трансформации одного из компонентов табачного дыма – бензопирена. На перво этапе под действием системы цитохромов бензопирен превращается в гидроксил ную форму и частично в бензопирен-7,8-диол, которые инактивируются под дейс вием глутатион- или сульфотрансфераз и выводятся из организма. Однако частич диольная форма бензопирена под действием эпоксид-гидролазы превращается бензопирен-7,8-диол-9,10-эпоксид. Это вещество способно связываться с ДНК вызывать активацию протоонкогенов или инактивацию генов-супрессоров опухол вого роста, что и приводит к развитию злокачественных новообразований (рис 2 и гл. 14). Увеличение активности ферментов 1-го этапа и снижение активности фе ментов 2-го этапа приводит к резкому повышению концентрации бензопирен-7

эл-9,10-эпоксида и увеличению риска опухолевой трансформации клетки. Таким разом, нарушение активности ферментов детоксикации организма, напрямую не занных с протоонкогенами и генами-супрессорами опухолевого роста, можно сматривать как еще один механизм образования опухолей.

Следует заметить, что в ряде случаев мутации в одних и тех же генах являются иологическим фактором возникновения рака различной локализации (см. табл. 6). Так, например, мутации в гене-супрессоре *RB1* довольно часто приводят к раз-гию злокачественной опухоли сетчатки глаза – ретинобластоме, но могут обусло-ивать возникновение остеосарком (злокачественных опухолей костной ткани). утации в гене *TP53*, отвечающем за апоптоз клетки, детерминируют малигниза-ю большинства опухолей различных органов и тканей. Возможно, это связано с иверсальностью некоторых механизмов регуляции жизнеобеспечения различных пов клеток.

Таким образом, сложный процесс канцерогенеза, обусловленный комбиниро-нным действием целого комплекса генетических и внешнесредовых факторов, югообразен и недостаточно изучен. Это существенно затрудняет профилактику кологических заболеваний на основе выявления лиц, имеющих высокий риск зникновения различных форм рака. Исключения составляют пременопаузный се-йный рак молочной железы (*BRCA-1*), постменопаузный семейный рак молочной лезы (*BRCA-2*), наследственный полипоз толстой кишки (*APC*), наследственный нолипозный рак толстой кишки (*MSH-2, MLH-1, PMS-1, PMS-2*), синдром и -Фраумени (*TP53*), наследственная ретинобластома (*RB-1*), нейрофиброматоз *IF-1, NF-2*), раки эндокринных желез (наиболее частый – щитовидной железы *MEN)*). Все эти формы злокачественных новообразований, как правило, протекают механизму потери гетерозиготности и в большинстве случаев являются следственными. Гетерозиготные носители мутаций, вызывающих эти формы ухолей, имеют практически 100%-й риск возникновения соответствующих онко-огических заболеваний.

глава 25

ПРОФИЛАКТИКА НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ

Один из наиболее важных разделов медицинской генетики – профилактика наследственной патологии у человека. В последние годы, в связи с ухудшением экологической ситуации и увеличением воздействия неблагоприятных факторов внешней среды на организм человека роль профилактических мероприятий значительно возрастает. Выделяют две основных группы профилактических мероприятий: 1) предотвращение рождения ребенка с наследственной патологией (**первичная профилактика**); 2) снижение риска развития заболевания у лиц с патологическими изменениями генотипа (**вторичная профилактика**). В настоящее время наибольших успехов удалось добиться при проведении первичной профилактики наследственной патологии, основой которой является медико-генетическое консультирование.

25.1. МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ КАК ОСНОВА ПЕРВИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Медико-генетическое консультирование (МГК) – это один из видов специализированной медицинской помощи, направленный на предотвращение рождения ребенка с наследственным заболеванием. Впервые медико-генетическая консультация была организована выдающимся отечественным невропатологом С.Н. Давиденковым в конце 20-х гг. прошлого века на базе Института нервно-психиатрической профилактики в Москве, а первый кабинет по медико-генетическому консультированию был открыт в 1941 году в Мичиганском университете в США. Принято считать, что термин «генетическая консультация» был предложен С. Ридом в 1947 г. Именно он впервые написал краткое руководство по генетическому консультированию. В настоящее время в нашей стране и за рубежом создана сеть медико-генетических консультаций и Центры медико-генетической помощи, основная функция которых заключается в предупреждении возникновения наследственных заболеваний в семье. Ведущим учреждением по генетическому консультированию в нашей стране является Медико-генетический научный центр РАМН в Москве. Значительную рабо-

ту по медико-генетическому консультированию выполняют Межрегиональные центры в г. Воронеже, Самаре, Санкт-Петербурге, Уфе и др.

Как правило, люди обращаются к врачу-генетику для того, чтобы получить прогноз здоровья будущего ребенка. Наиболее часто врачу генетику приходится проводить, так называемое, *ретроспективное* консультирование, которое осуществляется в семье, уже имеющей больного ребенка. В этом случае, основная цель генетического консультирования состоит в определении повторного риска рождения больного ребенка в семье и в планировании профилактических мероприятий. Реже врач проводит *проспективное* консультирование, которое осуществляется в семье, имеющей повышенный риск рождения больного ребенка. Наиболее часто за такими консультациями обращаются супруги, состоящие в кровном родстве; пары при наличии случаев наследственного заболевания в родословной мужа или жены, а также при воздействии на беременную женщину неблагоприятных средовых факторов. Безусловно, проспективное консультирование — наиболее эффективный способ профилактики наследственных заболеваний. Особенно большое значение проведение проспективного консультирования приобрело в последнее десятилетие, когда на основании ДНК-анализа стало возможным установление гетерозиготного носительства супругами мутации в одном и том же гене, а также выявление патологических изменений в генотипе на доклинической стадии. Это позволяет своевременно предупредить консультирующихся о высоком риске возникновения наследственного заболевания или появления у них больного потомства.

МГК состоит из нескольких этапов. Первый, наиболее важный этап, заключается в постановке диагноза наследственного заболевания и определении типа его наследования. Второй этап подразумевает установление генотипов консультирующихся и членов их семей с последующим расчетом риска возникновения заболевания. На третьем этапе исследуется возможность профилактических мероприятий, и определяется наиболее эффективный способ их проведения. Помимо этих трех основных задач большое значение при консультировании имеет психологическая и правовая помощь. Необходимо объяснить консультирующимся и членам их семей смысл результатов генетических анализов, помочь в решении морально-этических и правовых проблем, оказать психологическую помощь по решению вопросов планирования семьи, социальной адаптации и т.д.

Первый этап МГК заключается во всестороннем обследовании больного, направленном на уточнение диагноза. Значительное внимание на этом этапе уделяется сбору генеалогической информации и анамнестических данных. Предположение о наследственном характере заболевания и установление типа его наследования может быть сделано на основании анализа родословной пробанда и тщательном обследовании всех членов консультирующейся семьи. При наличии сегрегации заболевания в родословной можно с высокой долей вероятности прогнозировать генотип всех родственников пробанда и определить круг лиц нуждающихся в проспективном и ретроспективном МГК.

Уточнение нозологической формы наследственного заболевания должно проводиться с использованием всех доступных методов обследования. В первую очередь осуществляется клинический осмотр больного и членов его семьи с целью выявления фенотипических проявлений болезни. Учитывая варьирующую экспрессив-

ность большинства наследственных патологий, особое значение должно придаваться тщательности физикального обследования, при котором необходимо обращать внимание на малейшие признаки болезни. Врач-генетик должен быть знаком со всеми клиническими симптомами наследственных заболеваний и учитывать возможность существования стертых и атипичных форм. Этап постановки диагноза может быть ограничен использованием только клинического обследования больного. Это происходит в двух случаях: 1) если фенотипические проявления заболевания позволяют четко и однозначно поставить диагноз и семья не нуждается в дородовой диагностике; 2) если этиология и патогенез заболевания не известны и использование дополнительных генетических методов для уточнения диагноза невозможно. Иногда для уточнения диагноза необходимы дополнительные консультации специалистов различного профиля (офтальмолога, невропатолога, ортопеда и др.), а также лабораторное и инструментальное обследование. В последние годы при проведении диагностической процедуры достаточно широко используются компьютерные базы данных и информационно-диагностические системы, такие как POSSUM, LDDB, SYNGEN, CHRODYS, MEDGEN и другие.

Данные клинического осмотра, выявление характерных симптомов и параклинических признаков, позволяют предположить у консультируемого определенное наследственное заболевание. Для подтверждения диагноза необходимы специальные методы обследования. К таким методам относятся, прежде всего, цитогенетические, биохимические и молекулярно-генетические.

Решение о необходимости исследования кариотипа больного и/или членов его семьи врач принимает на основании наличия признаков, характерных для хромосомной патологии (гл. 20).

При подозрении на наследственную болезнь обмена проводят биохимическое исследование. На первом этапе такого исследования определяют концентрации в крови или моче метаболитов, накапливающихся при нарушении обменных превращений определенных субстратов, вводимых с пищей или синтезирующихся в организме. Если концентрация каких-то метаболитов повышена, можно сделать заключение о нарушении метаболизма определенных веществ и перейти ко второму этапу биохимического исследования. Его цель – определить снижена ли активность ферментов, участвующих в метаболизме этих веществ. В качестве примера такого двухэтапного обследования можно привести схему диагностики одной из групп болезней накопления – *мукополисахаридозов*. На первом этапе у больных с клиническими симптомами гаргоилизма проводят исследование концентрации гликозамингликанов в моче – гепарансульфата, дерматансульфата, кератансульфата, хондроитин-4 и хондроитин-6 сульфатов. При увеличении концентрации тех или иных метаболитов, в зависимости от их сочетания, планируется последовательность этапов проведения энзимодиагностики с целью идентификации нозологической формы мукополисахаридоза (подробнее об этом см. гл. 23).

При других моногенных заболеваниях точная диагностика генетического варианта наследственного заболевания возможна на основании проведения ДНК-анализа, направленного на выявление мутации в тех или иных генах. Схема проведения молекулярно-генетической диагностики описана в гл. 19, а особенности ДНК-диагностики отдельных моногенных заболеваний представлены в гл. 21и 22.

Второй этап МГК осуществляется после уточнения диагноза и направлен на расчет риска возникновения заболевания у всех родственников пробанда на основании типа наследования и установления генотипов консультирующихся. До недавнего времени генотип членов семьи пробанда с моногенным заболеванием можно было установить только с определенной долей вероятности, в результате теоретических расчетов с использованием генетических закономерностей наследования. В настоящее время благодаря совершенствованию методов ДНК-анализа, число заболеваний, при которых оказывается возможным прямое установление генотипов всех членов отягощенной семьи, постоянно увеличивается. Кроме того, при АД заболеваниях с поздним началом возможно проведение *пресимптоматической (доклинической) диагностики*, которая позволяет прогнозировать развитие заболевания у носителя определенного генотипа и дает ему возможность принять решение о планировании деторождения. Несмотря на это, теоретические расчеты риска возникновения заболевания не потеряли своей актуальности и в ряде случаев активно используются при МГК. Кроме того, знания принципов расчета генетического риска позволяют оптимизировать диагностическую процедуру и определять целесообразность проведения тех или иных дорогостоящих лабораторных исследований. Все это обусловливает необходимость владения методиками расчета генетического риска.

Лучше всего разработаны основы прогнозирования при моногенной наследственной патологии, когда расчет генетического риска производится на основании вероятности образования определенного типа гамет при различных вариантах наследования заболевания. В табл. 25.1 представлены сводные данные о соотношении количества больных и здоровых потомков в различных типах браков.

Если точная идентификация генотипов консультируемых невозможна, используют основные положения теории вероятностей. При этом рассчитываются значения следующих вероятностей:

- априорная вероятность — определяется как вероятность наличия определенного генотипа у консультируемого на основании типа наследования и особенностей клинических проявлений заболевания;
- условная вероятность — отражает вероятность рождения здорового ребенка у индивида с априорно заданным генотипом при учете ряда параметров: пенетрантности гена, возрастных интервалов манифестации заболевания, состояния здоровья имеющихся детей и др.
- совместная вероятность - рассчитывается как произведение априорной и условной вероятностей и определяет вероятность совместного наступления событий;
- апостериорная вероятность — вероятность для консультируемого иметь тот или иной генотип при наличии здорового ребенка (рассчитывается как отношение совместной вероятности для определенного генотипа к сумме совместных вероятностей возможных генотипов).

Зная апостериорную вероятность можно легко рассчитать риск рождения больного ребенка в каждом конкретном случае.

Иногда при определении вероятности оказывается необходимым учитывать дополнительные факторы, такие как частота гетерозигот в популяции, распространенность заболевания, пенетрантность гена, коэффициент инбридинга, частота встречаемости отдельных генетических вариантов наследственного заболевания. Мето-

Таблица 25.1. **Частота генотипов больных и здоровых потомков при различных типах наследования заболевания в зависимости от генотипов родителей:**

1) при аутосомном наследовании

Генотипы родителей	АД-тип наследования			АР-тип наследования		
	Генотипы больных, %		Генотипы здоровых, %	Генотипы больных, %	Генотипы здоровых, %	
	AA	Aa	aa	aa	Aa	AA
AA × AA	100	–	–	μ^2	μ	100
AA × Aa	50	50	–	μ	50	50
AA × aa	μ	100	–	μ	100	–
Aa × Aa	25	50	25	25	50	25
Aa × aa	–	50	50	50	50	–
aa × aa	–	2μ	100	100	–	–

μ – частота мутирования по данному локусу на гамету на поколение.

2) при Х-сцепленном наследовании

Генотипы родителей	Х-сц. рецессивный тип наследования					Х-сц. доминантный тип наследования				
	Генотипы больных, %		Генотипы здоровых, %			Генотипы больных, %			Генотипы здоровых,%	
	дев	м	дев		м	дев		м	дев	м
	X'X'	X'Y	XX	X'X	XY	XX	X'X	XY	X'X'	X'Y
XX × XY	0	μ (μ^2)	100	–	100	100	–	100	0	0
XX × X'Y	0	0	0	100	100	0	100	100	0	0
XX' × XY	0	50	50	50	50	50	50	50	0	50
XX' × X'Y	50	50	–	50	50	0	50	50	50	50
X'X' × XY	0	100		100	0	0	100	0	0	100
X'X' × X'Y	100	100	0	0	0	0	0	0	100	100

X' – Х-хромосома, несущая рецессивный аллель;
м – мальчики, дев – девочки.

дики расчета генетического риска при различных наследственных заболеваниях рассматриваются в приложении к данной главе.

Таким образом, на данном этапе обратившихся за медико-генетической помощью знакомят с генетическим прогнозом (риском) для потомства, объясняют возможности проведения профилактики для данного конкретного случая. Генетический риск до 5% считается низким, риск от 6% до 20% – средним, а свыше 20% – высоким. При проведении этого этапа МГК требуется объяснить родителям отсутствие их вины за рождение больного ребенка и оказать психологическую помощь при принятии решения о дальнейшем деторождении. Консультирование семьи не должно быть директивным: врач не должен давать рекомендаций и тем более указаний по планированию деторождения. Принятие решения – прерогатива супружеской пары.

Третий этап МГК не является обязательным и зависит от принятого супругами решения по поводу дальнейшего деторождения. По сути, этот этап заключительный, так как, при соответствующих методологических возможностях и желании супружеской пары, направлен на предотвращение появления больного потомства в семье.

Существует два основных подхода, позволяющих выявлять генотипы, определяющие высокий риск развития заболевания у будущего ребенка – это *пренатальная* и *преимплантационная диагностика*.

25.1.1. ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

В последние годы благодаря успешному развитию цитогенетики, биохимии и молекулярной биологии, оказалось возможным выявлять хромосомные и генные мутации у человека не только в постнатальном периоде, но и на разных сроках пренатального развития, т.е. дородовая диагностика наследственной патологии стала реальностью. Пренатальная (дородовая) диагностика включает комплекс мероприятий, направленных на предотвращение появления больного ребенка в семье. Наибольшие успехи достигнуты в дородовой диагностике хромосомных синдромов и моногенных заболеваний, в то время как прогнозирование патологии, характеризующейся полигенным наследованием, существенно затруднено. Методы пренатальной диагностики принято делить на инвазивные и неинвазивные.

При применении **инвазивных методов** производят трансабдоминальный (через брюшную стенку) или трансцервикальный (через влагалище и шейку матки) забор клеток плода на различных сроках беременности и их последующий анализ (цитогенетический, молекулярно-генетический, биохимический и т.д.). Цитогенетические методы исследования позволяют выявить хромосомные аберрации у плода, с помощью биохимических методов определяют активность ферментов или концентрацию некоторых продуктов метаболизма, молекулярно-генетический анализ дает прямой ответ на вопрос о том, есть ли у плода патологическая мутация в исследуемом гене. Применение инвазивных методов дородовой диагностики оказывается наиболее эффективным, так как их результаты позволяют с высокой точностью судить о наличии у плода наследственной патологии. Забор плодного материала для дородовой диагностики может осуществляться на разных сроках беременности под контролем ультразвука. В ранние сроки беременности (от 8 до 12 недель) для анализа используют клетки плода, выделенные из материала ворсин хориона или плаценты, полученные путем хорион- или плацентобиопсии (рис. 25.1, *а*, *б*). Эти сроки беременности являются оптимальными для проведения дородовой диагностики, так как раннее обнаружение патологических изменений генотипа плода позволяет прервать беременность с минимальным риском для организма матери. Кроме того, при диагностике хромосомных аберраций у плода не требуется культивирования клеток, что позволяет получить результаты уже через 3–4 дня. Однако, несмотря на очевидные преимущества ранней пренатальной диагностики, существуют и некоторые недостатки, связанные, прежде всего, с возникновением угрозы выкидыша. Показано, что у 10% 12% женщин после проведения этой процедуры отмечаются маточные кровотечения, у 3% повышается тонус матки, а в 1,5%-2% случаев происходит самопроизвольное прерывание беременности. В ряде случаев, при нарушении технологии забора плодного материала возможно инфицирование организма плода и матери.

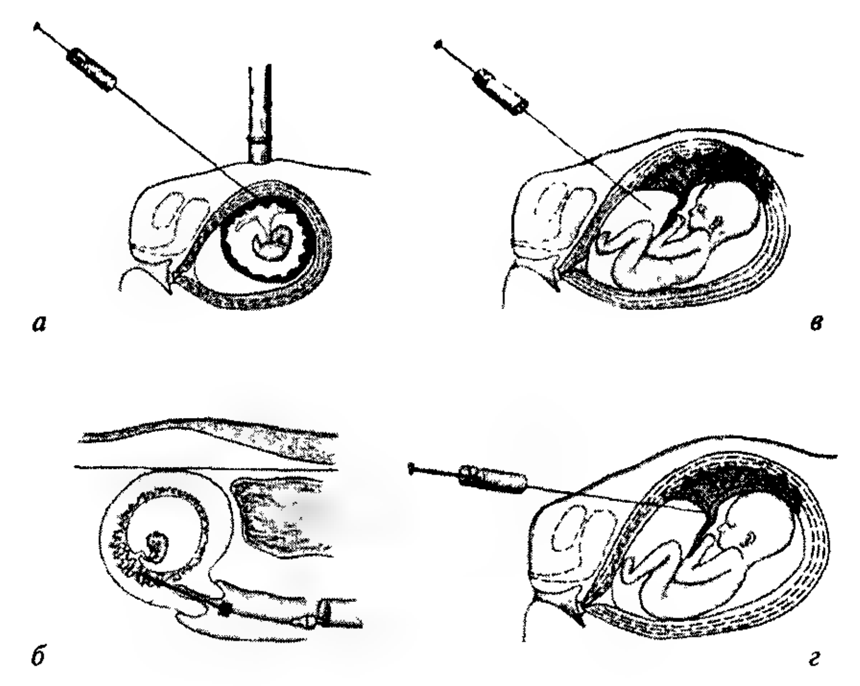


Рис. 25.1. *Способы забора плодного материала для проведения пренатальной диагностики.* (Из: Н.П. Бочков, 1997)

а – трансабдоминальная хорион- или плацентобиопсия; б – трансцервикальная хорион- или плацентобиопсия, в – амниоцентез; г – кордоцентез

В более поздние сроки беременности (15–18 недель) для проведения пренатальной диагностики используют трансабдоминальный амниоцентез (рис. 25.4, *в*) и затем исследуют клетки плода, выделенные из амниотической жидкости. Эта процедура значительно менее травматичная и приводит к неплановому прерыванию беременности не более чем в 0,2% случаев. К недостаткам этого метода можно отнести: 1) необходимость культивирования клеток для цитогенетического исследования (процедура занимает 2–3 недели); 2) необходимость искусственной стимуляции родов во втором триместре беременности при выявлении патологических изменений генотипа плода, что может отрицательно сказаться на репродуктивной функции женщины. Проведение амниоцентеза на более поздних сроках беременности целесообразно при подозрении на наследственную патологию обмена, а также в том случае, если на раннем сроке у беременной была угроза выкидыша.

Если осуществление дородовой диагностики оказывается возможным только после 18 недель или необходимо диагностировать наследственные болезни крови и степень резус-сенсибилизации, наиболее часто в качестве объекта исследования используют клетки крови, полученные из пуповины путем кордоцентеза (рис. 25.4, *г*). Клетки крови – наиболее удобный материал и для цитогенетического анализа, так как их культивирование происходит значительно быстрее, точность полученных результатов значительно выше, а спектр выявляемых хромосомных аномалий шире.

В очень редких случаях объектом исследования служат образцы различных тканей плода. Это необходимо, например, для диагностики наследственных болезней, этиология которых не известна, а диагноз может быть поставлен только на основании морфологических изменений. Безусловно, изучение молекулярно-генетических механизмов этой группы заболеваний приведет к тому, что данный метод дородовой диагностики потеряет свое значение и будет заменен прямым анализом гена на наличие в нем мутационного повреждения.

В последние годы интенсивно разрабатываются **неинвазивные методы** дородовой диагностики различной наследственной патологии. Риск осложнений при их проведении существенно ниже, чем при использовании инвазивных методов. Наиболее часто неинвазивные методы применяют для диагностики у плода врожденных пороков развития и хромосомных синдромов. Эти методы не требуют забора плодного материала, а диагностика того или иного вида патологии осуществляется на основании ультразвукового обследования плода или иммуноферментного анализа сыворотки крови беременной женщины. Наибольшего эффекта можно добиться при проведении массового обследования всех беременных женщин (*скрининг*). На основании полученных результатов формируются, так называемые «группы риска», состоящие из беременных женщин, у которых предполагается рождение больного ребенка. При формировании групп риска чрезвычайно важны результаты исследования концентрации трех групп сывороточных маркеров: α-фетопротеина (АФП), хорионического гонадотропина (ХГ) и неконъюгированного эстриола (НЭ). Диагностическое значение при обследовании имеет отклонение показателей концентрации этих маркеров от контрольных цифр для определенного срока беременности. В ряде случаев при отсутствии возможности проведения массового скрининга осуществляется выборочное обследование беременных. При формировании групп для такого селективного скрининга учитывается возраст супругов, данные анамнеза и клинико-генеалогического обследования. Критериями отбора пациенток является: возраст старше 35 лет, задержка развития плода, наличие врожденных пороков и/или хромосомных перестроек у одного из родителей или у предыдущего ребенка в семье.

В качестве диагностического теста при формировании группы риска по возникновению дефектов нервной трубки можно использовать определение в плазме крови беременной концентрации гомоцистеина, обладающего токсическим действием на клетки плода и плодных оболочек. Ценность этого скрининг-теста определяется возможностью профилактики осложнений гипергомоцистеинемии матери путем своевременного назначения беременной женщине препаратов фолиевой кислоты и витаминов группы В (веществ участвующих в превращении гомоцистеина в метионин).

Проведение ультразвукового обследования плода наиболее эффективно во втором триместре беременности, так как позволяет выявить большинство пороков развития конечностей, желудочно-кишечного тракта, сердца, почек, а также грубые пороки центральной нервной системы. Однако существует ряд ультразвуковых маркеров, имеющих большое диагностическое значение в первом триместре беременности. К ним относятся – увеличение размеров шейной складки, отсутствие у плода закладки носового хряща, многоводие и др.

Наибольшая эффективность неинвазивной дородовой диагностики может быть достигнута при комплексном анализе результатов всех методов обследования с помощью компьютерных программ расчетов риска.

Среди неинвазивных методов дородовой диагностики в настоящее время наиболее перспективен анализ клеток плода выделенных из крови матери. В крови беременной женщины в очень малом количестве присутствуют некоторые ядросодержащие клетки плода: трофобласты, лимфоциты, гранулоциты, эритробласты. Они появляются в результате трансплацентарного переноса и приводят к развитию толерантности организма матери по отношению к плоду. Концентрация этих клеток в крови матери ориентировочно составляет 10^{-5}–10^{-8}. В настоящий момент наибольшее диагностическое значение имеет исследование эритробластов, что связано с некоторыми их характеристиками: 1) наличием полного комплекта ядерных генов; 2) появлением в крови беременной женщины в I триместре (в результате гемопоэза в желточном мешке); 3) присутствием в крови женщины не более 90 дней после родов, что исключает отбор для анализа эритробластов от предыдущих беременностей.

Недостатком этого метода является отсутствие эффективных методов сортировки и детекции клеток плода, получаемых из крови матери. Обычно используют морфологические, биохимические и иммунологические методы, однако наибольшей эффективности удается добиться при использовании ПЦР для амплификации генома единичных клеток или свободной ДНК плода, присутствующей в материнской плазме и сыворотке в концентрации 3,4–6,2%.

25.1.2. ПРЕИМПЛАНТАЦИОННАЯ ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

В последние годы разработаны методы исследования ДНК клеток зародыша на ранних стадиях развития зиготы. Материалом для исследования служат клетки зиготы на стадии бластоцисты (8–16 клеток), полученные путем оплодотворения in vitro или с помощью маточного лаважа в период 90–130 часов после оплодотворения. С помощью микрохирургических манипуляций от зародыша можно отделить 1–2 клетки для последующего генетического анализа. Остальные зародышевые клетки могут быть заморожены до окончания исследования. После исключения наследственной патологии этим клеткам можно создать условия для нормального развития и имплантировать их в матку в соответствующий период менструального цикла.

Преимуществом этого метода является отсутствие необходимости искусственного прерывания беременности при обнаружении наследственной патологии плода, что благоприятно для последующей репродуктивной функции женщины.

Основной недостаток этого метода — низкий процент успешных имплантаций — 10–20%, а также возможные нарушения течения беременности после имплантации зародыша.

25.2. ПРОГРАММЫ БИОХИМИЧЕСКОГО СКРИНИНГА КАК ОСНОВА ВТОРИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ

Основной метод вторичной профилактики, направленной на предотвращение клинических проявлений у лиц с патологическими изменениями генотипа, биохимический скрининг (screening – просеивание). Используются два основных типа скрининговых программ: массовые (или тотальные) и селективные. **Массовый скрининг** проводится безвыборочно в определенной популяции. Заболевания, для которых целесообразно разрабатывать программы массового скрининга, должны удовлетворять следующим условиям:

1) значительная распространенность,

2) тяжелое прогредиентное течение, приводящее к инвалидизации при отсутствии лечения,

3) наличие эффективного метода лечения,

4) существование эффективного метода диагностики.

Выбранный для массовой диагностики метод должен быть прежде всего диагностически значимым, т.е. в идеале *чувствительность* (отношение истинно положительных тестов к сумме всех лиц с искомым дефектом) и *специфичность* (отношение истинно отрицательных тестов к сумме всех лиц с отсутствием дефекта) должны равняться 100%. При этом ложноположительные результаты допустимы, тогда как ложноотрицательные дискредитируют программу. Используемый метод должен быть простым, надежным, экономичным.

Наиболее часто массовый скрининг направлен на выявление аутосомно-рецессивных заболеваний среди новорожденных детей. В большинстве популяций новорожденных тестируют на фенилкетонурию (ФКУ) и врожденный гипотиреоз (ВГ), однако спектр заболеваний, выявляемых в ходе массового просеивания, может варьировать в различных популяциях. Например, в странах Средиземноморья с высокой распространенностью гемолитических анемий целесообразен скрининг на гетерозиготное носительство мутаций в генах, кодирующих Г-6-ФДГ и глобиновые белки, а в популяции евреев-ашкенази – на гетерозиготное носительство мутаций в гене гексозаминидазы А (болезнь Тея–Сакса).

Программы **селективного скрининга** направлены на диагностику ряда наследственных заболеваний среди больных с определенной патологией, составляющих группу риска. Например, в группе лиц с врожденной катарактой целесообразно проводить скрининг на галактоземию, а среди больных с частыми обструктивными бронхитами – на муковисцидоз.

Скринирующие программы обычно проводятся в два этапа.

На первом этапе — *первичной диагностики* — выявляют лиц с положительным результатом теста, формирующих группу риска по данному заболеванию. Для диагностики на данном этапе возможно использование простых качественных реакций (гл. 19).

Второй этап — *уточняющий* — необходим для подтверждения диагноза и исключения лиц с ложноположительными результатами. На этом этапе используют более сложные высокоточные аналитические (количественные) методы (гл. 19).

В ряде случаев проведение скрининга не ограничивается двумя этапами и требует проведения дополнительного исследования, направленного на *дифференциальную диагностику* сходных по клиническим проявлениям генетических вариантов болезни. На этом этапе применяют наиболее сложные и дорогостоящие методы энзимодиагностики и ДНК-анализа.

Рассмотрим процедуры биохимического скрининга на примере диагностики гиперфенилаланинемий и врожденного гипотиреоза. Диагностику этих заболеваний можно проводить одновременно при исследовании образцов крови, полученных от новорожденного ребенка в возрасте 3–7 дней. Эти сроки забора материала для анализа являются оптимальными, что связано с особенностями метаболизма исследуемых веществ. Именно к этому периоду времени у больного с ГФА происходит накопление фенилаланина в крови в концентрациях, достаточных для диагностики, а уровни ТТГ и гормонов щитовидной железы у здоровых новорожденных нормализуются.

25.2.1. ПРОГРАММА БИОХИМИЧЕСКОГО СКРИНИНГА ГИПЕРФЕНИЛАЛАНИНЕМИЙ (ГФА)

Этапы проведения биохимического скрининга на ГФА схематически представлены на рис. 25.2.

В ходе первого, *диагностического*, этапа возможно использование качественных тестов, выявляющих повышенную концентрацию фенилкетонов в моче (проба Феллинга и проба с 2,4-динитрофенилгидразином) или фенилаланина в крови при помощи микробиологических ингибиторных тестов Гатри или Гольдфарба. Однако в настоящее время в большинстве случаев применяют флуориметрический метод, позволяющий быстро и точно определить увеличение концентрации фенилаланина в крови обследуемого и сформировать группу риска.

На *уточняющем* этапе проводится повторное обследование всех детей с положительным тестом с целью подтверждения наличия повышенной концентрации фенилаланина и его дериватов в крови. Наиболее часто также используется флуориметрический метод. В ходе этого этапа выявляются дети с ложноположительными результатами (их причиной могут быть транзиторная гиперфенилаланинемия и тирозинемия) и формируется группа новорожденных, нуждающихся в длительной диетотерапии (гл. 23).

При концентрации фенилаланина в сыворотке крови >15мг% предполагается диагноз ФКУ, а при концентрации фенилаланина 6–15 мг% – ГФА. Всем детям с положительным тестом назначают диету, на основании терапевтической эффективности

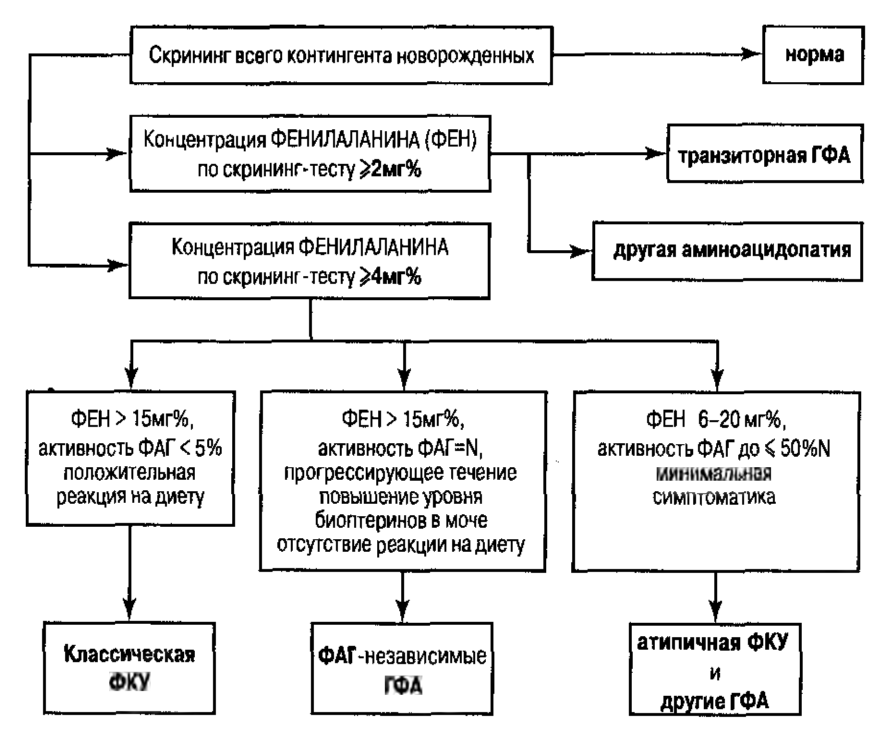


Рис. 25.2. Схема оптимальной скрининговой программы ГФА

которой планируются мероприятия по уточнению диагноза и выбору дальнейшей тактики лечения.

Задача следующего этапа – *дифференциальная диагностика* наследственных заболеваний, сопровождающихся повышением концентрации фенилаланина (гл. 23). С этой целью проводится пероральная нагрузка фенилаланином, измерение активности ФАГ в гепатоцитах, полученных при биопсии, лейкоцитах и фибробластах; ДГПР в фибробластах; исследование птеринов в моче.

25.2.2. ПРОГРАММА БИОХИМИЧЕСКОГО СКРИНИНГА ВРОЖДЁННОГО ГИПОТИРЕОЗА (ВГ)

Врожденный гипотиреоз – группа моногенных и мультифакториальных заболеваний, характеризующихся снижением или даже отсутствием функции щитовидной железы. Биохимическая причина этого заболевания – недостаток тиреоидных гормонов, прежде всего циркулирующего тироксина.

Снижение функции щитовидной железы вызывает изменения в метаболизме белков, жиров, углеводов, замедляя окислительные процессы и основной обмен, те-

плообмен. Нарушается обмен и мукополисахаридов, вследствие чего в тканях накапливаются креатинин и большое количество муцинозного вещества. Накопление этих веществ приводит к возникновению слизистого отека — микседемы.

Клинические проявления заметны уже в первые месяцы жизни. При осмотре выявляются большая масса тела, грубые черты лица, увеличение языка, пупочная грыжа, грубый голос, повышенная сухость и ломкость волос. Для больных характерны сухость, шелушение и бледность кожных покровов. В результате нарушения теплообмена кожа больных холодная на ощупь. При отсутствии лечения прогрессирует отставание в психомоторном и физическом развитии, в последующем формируется олигофрения.

Наиболее яркая картина ВГ проявляется лишь к 4 -6 мес. жизни, когда уже имеются тяжелые соматические и метаболические нарушения и эффективность лечения резко снижена. Это обусловливает необходимость ранней диагностики заболевания путем биохимического скрининга.

В качестве основного теста используют определение в крови концентрации ТТГ гипофиза и гормонов щитовидной железы (тироксина и трийодтиронина), что позволяет выявить ВГ с первых дней жизни, прогнозировать степень тяжести заболевания и объем заместительной терапии. Концентрацию этих гормонов определяют двумя методами: иммуноферментным и радиоиммунным. На первом этапе диагностического скрининга целесообразно и экономически эффективно определять концентрацию ТТГ гипофиза с помощью иммуноферментного метода. Все дети с концентрацией ТТГ >20 мкЕд/мл нуждаются в проведение уточняющего обследования в 2-недельном возрасте. К этому сроку нормализуется большинство транзиторных нарушений функции щитовидной железы, обусловленных патологическими состояниями плода и новорожденного (фето-плацентарной недостаточностью, функциональной незрелостью, родовой травмой ЦНС, внутриутробной инфекцией) и патологией щитовидной железы у матери. В большинстве случаев эти нарушения не требуют терапевтической коррекции, однако, если при проведении повторного исследования в 2-недельном возрасте у ребенка концентрация ТТГ превышает 5мкЕд/мл, то необходима консультация эндокринолога и назначение курса L-тироксина. Все дети с повышенной концентрацией ТТГ и низкими цифрами гормонов щитовидной железы нуждаются в дополнительном обследовании и находятся под наблюдением эндокринолога до 3-х летнего возраста, когда может быть поставлен окончательный диагноз ВГ.

25.3. БИОЭТИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ПРОФИЛАКТИКИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ

Использование современных геномных технологий для профилактики наследственных заболеваний привело, с одной стороны, к повышению эффективности медико-генетической помощи, а с другой — к необходимости решения ряда биоэтических проблем. Это связано с тем, что в генетическом исследовании бывает задействовано

нного сторон: исследователь, врач-клиницист, испытуемый, донор, реципиент, пациент и члены его семьи. Косвенно в этих исследованиях могут участвовать и некоторые социальные службы: образования, трудоустройства, страхования (жизни, здоровья, имущества) и прочие, где люди вступают в отношения друг с другом в связи с проведением генетических исследований или приложением их результатов в своей сфере практической жизни. При этом люди могут по-разному работать с образцами биоматериала: осуществлять их забор и изучение, технологически трансформировать, передавать их другим лицам (исследователям, врачам, кому-либо еще), вводить в организм реципиента образцы, содержащие генетическую информацию. Причем информацию они тоже могут использовать по-разному: хранить, передавать, распространять, уничтожать. Но к данной генетической информации причастны и те лица, которые являются испытуемыми, пациентами, членами их семей и т.д. При этом у этики генетики есть одно отличие от многих других разделов биомедицинской этики, а именно: не только сам испытуемый, но и его прямые потомки в нескольких поколениях могут оказаться объектами воздействия измененной генетической информации. В основе решения проблем, возникающих при получении и использовании генетической информации обследуемого индивида должны лежать следующие принципы.

1. *Признание автономии личности.* Важно, что все виды процедур должны осуществляться с информированного согласия объекта, которое означает, что человек вступает в контакт с генетиком, врачом или иным исследователем добровольно. При этом профессионал обязан обеспечить его в доступной форме адекватной информацией, чтобы она была и необходима, и достаточна, и понятна, и помогала бы автономной личности принимать самостоятельное решение о том, на что (на какие процедуры) она (личность) согласна пойти, а на что – не согласна. Приоритеты в этическом решении о проведении генетических процедур убывают в таком направлении: индивид, семья и кровные родственники, общество.

2. *Гиппократовское «не вреди» и «сотвори благо»,* направленное на сохранение конфиденциальности информации. Это правило проходит через все документы по биоэтической регламентации любой медицинской деятельности. Согласно этому правилу информация о генетическом статусе человека может быть сообщена только ему, его опекунам или иным легальным представителям и пользующим его врачам. Недопустима передача профессионалом какой-либо информации без санкции тестируемого или его законных опекунов любой третьей стороне (органам образования, трудоустройства, страхования, социальным службам и т.д.), так как это может повлечь за собой дискриминацию такого лица на основании сведений о его генетическом статусе, что равносильно своего рода «генетическому шовинизму».

3. *Справедливость,* которая подразумевает равные возможности генетического тестирования за счет общественных фондов для всех членов общества.

Таковы этические принципы медицинской генетики, сформулированные экспертами Всемирной Организации Здравоохранения по генетике человека (Genomics and World Health, WHO, 2002).

Наряду с этими основными принципами современной биоэтики при медико-генетическом консультировании необходимо руководствоваться еще тремя правилами: правилом правдивости, правилом конфиденциальности и правилом информи-

рованного согласия на проведение исследования. Также необходимо учитывать следующее обстоятельство – объектом исследования врача-генетика служит семья, и информация, полученная при генетическом исследовании, касается не только самого обследуемого и членов его семьи, но и будущих поколений.

Эти этические нормы нашли отражения и в Российском законодательстве: в статьях 41(гарантирующей право на охрану здоровья и медицинскую помощь) и 21 (защищающей от недобросовестного использования испытуемого в научных экспериментах) Конституции РФ, а также в «Основах законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан» (Постановление Госдумы от 22.07.93 №5488-1). Большое значение для общества имеет взгляд на биоэтические проблемы Русской Православной Церкви. В специальной главе «Социальной концепции Русской Православной Церкви» (2000), даны *взвешенные оценки* основным направлениям медицинской генетики и репродуктивной медицины и их совместимости с православием.

Биоэтические проблемы, требующие регламентации, возникают при проведении всех трех этапов МГК. Прежде всего это касается генетического скрининга и пресимптоматического ДНК-тестирования при наследственных болезнях. Эти проблемы связаны как с возможной дискриминацией лиц с положительными результатами тестов, так и с возможным влиянием таких результатов на психическое благополучие людей, здоровых на момент тестирования. В соответствии с международными нормами генетический скрининг и пресимптоматическое тестирование взрослых должны быть добровольными, причем их участники должны быть свободны в выборе (на основе достаточной информации) подвергнуться или нет тестированию в соответствии со своими взглядами и моральными принципами. Пресимптоматическое тестирование детей на заболевания с поздним началом при отсутствии методов лечения или профилактики следует отложить до достижения возраста, когда молодой человек сможет принять собственное решение относительно этого вопроса.

Скрининг детей для ранней диагностики и своевременного лечения в интересах их здоровья должен быть обязательным и бесплатным (например, скрининг новорожденных на фенилкетонурию). Важное условие такого скрининга – доступность своевременного и адекватного лечения заболевания. Если родители отказываются от такого обследования своего ребенка, то для защиты его интересов против них могут предприниматься правовые акции, предусмотренные законодательством.

При проведении генетического скрининга и пресимптоматического тестирования участники должны получить исчерпывающую информацию о целях, возможных результатах обследования и возможном выборе. Выявленные в ходе скрининга больные (или носители гена наследственного заболевания с поздним возрастом начала) должны получить генетическую консультацию для всесторонней информации о заболевании, его значении для индивида и членов его семьи, методах лечения и социальной поддержки, а также адекватную психологическую поддержку.

В настоящее время имеются ограниченные возможности для тестирования на предрасположенность к распространенным заболеваниям, таким как сердечно-сосудистые, онкологические и другие.

Любые виды генетического тестирования ВОЗ рекомендует проводить только в том случае, если его результаты могут быть эффективно использованы для профилактики и лечения заболевания, при условии полной информированности пациента и

его добровольном согласии. Во многих странах законодательно запрещено проведение генетического скрининга заболеваний, для которых невозможно лечение. При этом к результатам всех видов генетического тестирования не должны иметь доступа работодатели, страховые компании и другие третьи лица во избежание возможной дискриминации.

Значительные различия в суждениях медиков, пациентов, представителей разных религиозных культур наблюдаются в вопросе о прерывании беременности на основании результатов дородовой диагностики. Сторонники одной точки зрения считают, что искусственное прерывание беременности даже на основании безнадежного прогноза для плода недопустимо. Сторонники другой точки зрения полагают, что в безнадежной ситуации не следует возлагать на женщину, ее семью и общество моральное и материальное бремя по содержанию до естественной кончины неизлечимо пораженного индивида. Практически исключительна ситуация, когда сохранение плода означает гибель и его, и матери, т.е., когда приходится делать выбор между гибелью обоих или сохранением хотя бы жизни матери. Сохранение жизни матери в большинстве стран действует как этическая, профессиональная и правовая норма.

Этическая значимость вопроса о приемлемых сроках искусственного прерывания беременности усугубляется большим разбросом мнений относительно права эмбриона на жизнь. Одни полагают, что эмбрион имеет право на жизнь с момента зачатия. По мнению других такое право появляется только у уже рожденного ребенка вместе с овладением им членораздельной и осмысленной речью. Обе точки зрения едины в том, что одушевление нового индивида есть процесс мгновенный, не имеющий протяженности во времени. В действительности же, биологически процесс развития человека протекает во времени. Он проходит естественные стадии от раздельного формирования и созревания половых клеток в организмах мужчины и женщины, их объединение в половых путях женщины в единую оплодотворенную яйцеклетку (зиготу). На следующих этапах происходят: имплантация яйцеклетки (далеко не всегда успешная) в утробу матери и дальнейшее постепенное, закономерное развитие эмбриона (затем плода) до созревания способного к рождению и автономному существованию младенца. Где на этом сложном пути индивидуального развития организма и личности пролегает строгая граница, до которой зародыш является *частью тела* матери, а после – сразу самостоятельным индивидом и *личностью*?

Этические проблемы при решении вопроса о прерывании беременности несколько смягчаются наметившимися успехами в лечении прежде неизлечимых наследственных и врожденных болезней с помощью генотерапии.

Правовая и этическая регламентация применения биотехнологии в медицине должна строиться с учетом и международного опыта. Причем для решения возникающих проблем требуются совместные усилия медиков, генетиков, юристов, философов, социальных работников и богословов. Особое значение имеет и повышение информированности всего общества и отдельных его групп в вопросах генетики и использования современных генетических технологий. Это особенно важно для того, чтобы избежать в обществе как излишних страхов перед достижениями генетики, так и завышенных ожиданий, и наладить сотрудничество заинтересованных кругов в ответственном использовании результатов исследований генома человека.

Приложение: методики расчета генетического риска

РАСЧЁТ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РИСКА ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ С АУТОСОМНЫМ ТИПОМ НАСЛЕДОВАНИЯ

Генетический риск при заболеваниях с АД-типом наследования

1) *при полной пенетрантности гена*

- При АД-типе наследования болезнь развивается при наличии мутаций в гетеро- и гомозиготном состоянии. В соответствии с этим у пораженного родителя-гетерозиготы риск рождения больного ребенка составляет 50%, а у гомозиготы по патологическому АД-аллелю - 100%.
- Спорадические случаи АД-заболеваний обусловлены возникновением доминантной мутации de novo. В этом случае риск рождения больного ребенка при последующих беременностях равен удвоенному уровню мутирования по данному локусу в данной популяции, т.е. вероятности получения новой мутации от одного из родителей — 2μ. В практике медико-генетического консультирования этой величиной обычно пренебрегают из-за ее малых значений;

2) *при неполной пенетрантности гена*

При неполной пенетрантности гена в ряде случаев сложно установить генотипы родителей и рассчитать генетический риск. Однако в случае рождения больного ребенка у здоровых супругов, родитель или близкий родственник одного из которых болен, можно утверждать, что этот супруг гетерозиготен по данному гену, так как повторное возникновение одной и той же мутации у членов одной семьи маловероятно.

Приведем пример расчета генетического риска у членов родословной (рис. 25.3), отягощенной заболеванием, при котором пенетрантность гена (Р) составляет 70%. II_2 - гетерозигота, так как ее мать и дочь больны. Значит, вероятность появления больного ребенка у II_2 при браке со здоровым супругом составит — $1/2P = 35\%$, а здорового — $(1 - 1/2P) = 65\%$. Можно также рассчитать вероятность рождения клинически здоровых детей-носителей мутантного гена, которая составит — $1/2(1 - P) = 0,15$, доля их среди непораженных детей составит $(1 - P)/(2 - P) - 3/13$. Доля гомозигот по нормальному аллелю (неносителей гена) среди здоровых равна $1/(2 - P) = 10/13$. Для III_1 и II_3 расчет аналогичен.

У III_2 детей пока нет, и мы не можем определить его генотип. Он может быть здоровой гомозиготой по нормальному аллелю с вероятностью 10/13 и тогда все его дети будут здоровы, и здоровым гетерозиготным носителем с вероятностью 0,15, тогда риск рождения больного ребенка составит $0,35 \times 0,15 = 0,052$ (5,2%);

3) *при заболеваниях с поздним возрастом манифестации существуют некоторые особенности расчета риска,* заключающиеся в необходимости использовать дополни-

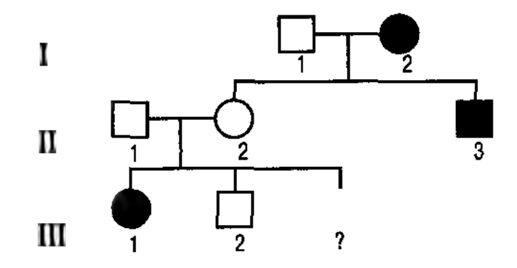


Рис. 25.3. Родословная с АД-заболеванием с неполной пенетрантностью

Таблица 25.2.

Вероятности	Вероятность генотипа Аа	Вероятность генотипа аа
Априорная	0,5	0,5
Условная	0,7	1
Совместная	0,35	0,5
Апостериорная	0,41	0,59

тельный показатель – возраст-зависимую пенетрантность. Приведем пример расчета риска при таких заболеваниях.

Пример. В медико-генетическую консультацию обратился здоровый мужчииа 35 лет, отец которого болен АД-заболеванием с поздним началом, по поводу прогноза здоровья и риска развития заболевания у его потомства. Пробанд имеет равную априорную вероятность гетеро- и гомозиготности по нормальному аллелю, и таким образом, 50%-ый риск развития заболевания. Однако известно, что к 35 годам клинические признаки этого заболевания выявляются лишь у 30% носителей гена. Таким образом, условная вероятность (вероятиость отсутствия клинических симптомов болезни в 35 лет у гетерозиготы по мутантному аллелю) составит 70% или 0,7, а апостериорная – 41% (0,41) (табл. 25.2). Отсюда риск рождения больного ребенка у пробанда составит $0{,}41 \times 1/2 = 0{,}205$, т.е. примерно 20%.

Генетический риск при заболеваниях с АР-типом наследования

Так как АР-заболевания проявляются только в гомозиготном состоянии, предполагается, что родители больных детей – здоровые гетерозиготы. Риск рождения больного ребенка в браке двух гетерозигот составляет 25%. Вероятность рождения больного ребенка при гомозиготности по нормальному аллелю одного или обоих родителей настолько мала (составляет μ и μ^2 соответственно), что при расчетах ею пренебрегают.

Рассмотрим несколько примеров.

1. Предположим, что одии из родителей (I_2) ребенка с аутосомно-рецессивным заболеванием решил вступить в новый брак (рис. 25.4). При этом предполагается,

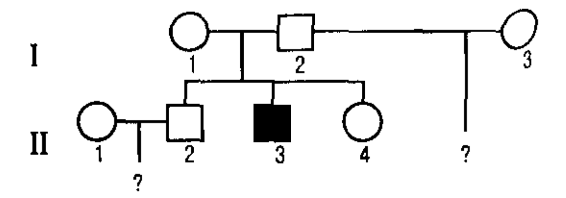


Рис. 25.4. Родословная с АР-заболеванием

что супруги, имеющие больного ребенка (II_3) с аутосомно-рецессивным заболеванием, являются гетерозиготными носителями мутантного аллеля (то есть, вероятность их гетерозиготности равна 1). Для расчета риска рождения ребенка с этим заболеванием в новой семье возникает необходимость определения вероятности гетерозиготного носительства мутации у нового партнера (I_3). Эти расчеты основаны на данных о распространенности заболевания в популяции и проводятся в соответствии с законом Харди–Вайнберга. Если известно, что частота этого заболевания составляет 1:10000 (q^2), то частота гетерозиготных носителей ($2pq$) в этой популяции равна 1:50 (гл. 19), что отражает вероятность гетерозиготности новой супруги консультирующегося. Таким образом, риск рождения больного ребенка в этом браке составит 1 × 1/50 × 1/4 = 1/200 или 0,5%.

2. При вступлении в брак сибсов больного АР-заболеванием для определения риска рождения больного ребенка необходимо рассчитать вероятность гетерозиготности обоих супругов (рис. 25.4). Вероятность гетерозиготности сибса (II_2) больного (II_3) составит 2/3, что отражает вероятность гетерозиготного носительства при отсутствии клинических симптомов. Расчет вероятности гетерозиготного носительства его супруги проводится так же, как и в предыдущем случае. Таким образом, вероятность рождения больного ребенка в этом браке составит 2/3 × 1/50 × 1/4 = 1/300 или 0,33%.

3. Особое значение приобретают расчеты риска возникновения аутосомно-рецессивной патологии в потомстве родителей, связанных кровным родством. Для этого необходимо составить по возможности более подробную родословную семьи с установлением генотипов максимального количества родственников. Особое внимание должно быть уделено выявлению в родословной заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования. При выявлении случаев наследственного заболевания в родословной определить генетический риск достаточно просто на основании расчета вероятностей генотипов всех членов родословной.

При отсутствии таких больных в родословной при расчетах риска возникновения заболевания у детей супругов, состоящих в кровном родстве, необходимо учитывать коэффициент инбридинга (F) (гл. 17), который отражает степень родства супругов, являясь мерой доли общих генов, унаследованных ими от общего предка, и вероятность гомозиготности их потомка по этим генам. Известно, что каждый человек гетерозиготен по нескольким генам, в гомозиготном состоянии обусловливающим аутосомно-рецессивные заболевания. Исходя из этого и зная коэффициент инбридинга, можно определить вероятность рождения у них больного ребенка с аутосомно-рецессивным заболеванием. В общем случае ожидаемая частота рецессивных признаков в потомстве от родственных браков равна $P_{рец} = 1/2F \times n$, где n – среднее число общих генов, несущих патологические мутации в гетерозиготном состоянии.

Для удобства расчетов принимается, что n = 2. Таким образом, показатель $P_{рец}$ – F и отражает вероятность появления больных детей с аутосомно-рецессивным заболеванием у супругов, состоящих в кровном родстве, в родословной которых не выявлено случаев заболевания.

При расчетах риска возникновения патологии у потомства при кровном родстве супругов необходимо также учитывать, что в таких браках повышена вероятность мертворождений и ранней детской смертности по сравнению с общей популяцией. Считается, что каждый человек несет в среднем 2–3 летальных эквивалента в рецессивном состоянии. Значит, вероятность гибели плода и новорожденного составляет $P_{лет}$ = 1/2F × n, где n – среднее число летальных генов, находящихся в гетерозиготном состоянии у каждой особи в популяции (примерно n – 3).

Таким образом, суммарный генетический риск появления больного потомства в браках кровных родственников складывается из: 1) риска возникновения рецессивных заболеваний; 2) риска перинатальной смертности; 3) общепопуляционного риска, который в среднем составляет 5%. Таким образом, общая формула расчета риска рождения больного ребенка у супругов, связанных кровным родством, имеет вид:

$$P = F + 3/2F + 5\%.$$

РАСЧЁТ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РИСКА ПРИ Х-СЦЕПЛЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Генетический риск при заболеваниях с Х-сцепленным доминантным типом наследования

Расчеты генетического риска при Х-сцепленных доминантных заболеваниях сходны с расчетами при АД-патологии. Если женщина страдает Х-сцепленным доминантным заболеванием, то она – гетерозиготна по данному гену, и в браке со здоровым мужчиной 50% ее детей независимо от пола будут поражены. Мужчина, больной таким заболеванием, является гемизиготой и передает мутантную Х-хромосому только своим дочерям, в то время как все его сыновья будут здоровы.

Генетический риск при заболеваниях с Х-сцепленным рецессивным типом наследования

Заболевания этой группы наблюдаются в основном у лиц мужского пола и возникают либо вследствие спорадической мутации, произошедшей в Х-хромосоме материнской гаметы, либо в том случае, если мать – гетерозиготная носительница пато-

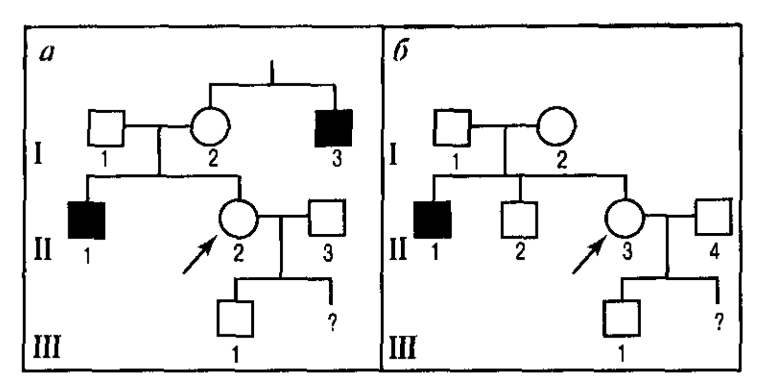


Рис. 25.5. Родословная с Х-сцепленным рецессивным заболеванием:
а – с сегрецией; б – без сегреции

логической мутации. В ряде случаев, при отсутствии убедительных генеалогических данных, свидетельствующих о наличии Х-сцепленной сегрегации заболевания в семье, необходимо рассматривать эти две вероятности, задавая им определенные веса. Однозначное утверждение о гетерозиготном носительстве патологического гена матерью больного можно сделать в следующих случаях:

1) если женщина имеет больного сына и больного брата и/или дядю со стороны матери; 2) если женщина имеет двух больных сыновей; 3) если женщина является дочерью больного с Х-сцепленным рецессивным заболеванием.

Во всех остальных случаях, при невозможности выявления гетерозиготного носительства, используют вероятностный подход к расчету генетического риска.

Рассмотрим пример следующей родословной (рис. 25.5, *а*). Необходимо рассчитать риск рождения больного ребенка у женщины, имеющей здорового сына, брат и дядя которой страдали Х-сцепленным рецессивным заболеванием.

Из представленной родословной ясно, что мать женщины-пробанда является облигатной носительницей мутантного гена в Х-хромосоме, так как ее сын и родной брат больны. Значит, ее дочь могла с равной вероятностью унаследовать мутантную или нормальную Х-хромосому. Эти значения составят показатели априорной вероятности. Условная вероятность для сына этой женщины быть здоровым составляет 0,5 и 1,0 соответственно. Отсюда апостериорная вероятность ее гетерозиготного носительства мутантного гена составляет 0,33% (табл. 25.3), а вероятность рождения больного сына составит 0,167 (≈17%), а не 0,25, как можно было бы предположить, если бы у пробанда не было здорового сына.

Таблица 25.3

Вероятность	Вероятность носительства (генотип XX')	Вероятность генотипа XX
Априорная	0,5	0,5
Условная	0,5	1
Совместная	0,25	0,5
Апостериорная	0,33	0,67

Таблица 25.4

Вероятность	Вероятность носительства (генотип XX')	Вероятность генотипа XX
Априорная	1/3 (2/3 × 1/2)	2/3
Условная	1/2	1
Совместная	1/3 × 1/2 = 1/6	2/3
Апостериорная	1/5	4/5

При расчете генетического риска для консультирующейся II_3, родословная которой представлена на рис. 25.5, *б*, необходимо использовать метод «фиктивной консультирующейся». В этом случае расчеты начинаются с определения вероятности носительства мутантного гена матерью пробанда I_2. Появление у I_2 больного сына может быть обусловлено как гетерозиготным носительством мутантного гена, так и возникновением гаметической мутации de novo. Таким образом, для проведения расчета генетического риска необходимо использовать показатели частоты мутирования гена в женских и мужских гаметах и отбора. При миопатии Дюшенна уровни мутирования в женских (μ) и мужских (ν) половых клетках равны. Больные не оставляют потомства и соответственно их фертильность (плодовитость) f = 0. Значит количество случаев, обусловленных новыми мутациями, составляет $m = (1 - f)\mu/(2\mu + \nu) = 1/3$. Таким образом, вероятность гетерозиготного носительства матери пробанда составляет 1 – 1/3 = 2/3, а априорная вероятность гетерозиготного носительства пробанда (2/3 × 1/2) = 1/3 (табл. 25.4). Дальнейшие расчеты производят аналогично предыдущему случаю.

Таким образом, риск рождения больного сына составит 1/5 × 1/2 = 0,1 (10%).

Генетический риск при хромосомных синдромах

Расчет генетического риска при хромосомных аномалиях, обусловливающих возникновение ряда синдромов, достаточно прост и основывается на таблицах эмпирического риска. Оценку генетического риска, как правило, проводят в трех ситуациях: 1) при рождении ребенка с хромосомным синдромом у родителей с нормальным кариотипом; 2) при выявлении мозаицизма у одного из родителей; 3)при семейных формах структурных аномалий аутосом.

При нормальных кариотипах родителей повторный риск рождения ребенка со структурными аномалиями аутосом очень низкий (менеее 1%), а с простыми анеуплоидиями зависит от возраста матери (табл. 25.5). Возраст отца, как правило, не влияет на возникновение анеуплоидий.

При наличии мозаичного варианта анеуплоидии у одного из родителей пробанда с хромосомным синдромом, риск для его сибсов определяется по формуле:

$$\frac{x\cdot}{(2 - x)} \cdot K,$$

где x – доля аномального клеточного клона, K – коэффициент элиминации несбалансированных зигот в эмбриогенезе.

Таблица 25.5. Генетический риск анеуплоидий в зависимости от возраста матери

Возраст матери, годы	Суммарный популяционный риск при трисомиях по 13-, 18- и 21-й хромосомами, %	Риск при синдроме Дауна, %
≤19	0,08	
20–24	0,06	1%
25–29	0,1	
30–34	0,2	
35–39	0,54	1,08
40–44	1,6	3,2
≥45	4,2	8,4

Таблица 25.6. Генетический риск при наиболее частых транслокационных формах трисомий

Название синдрома	Тип транслокации	Риск при различных типах транслокаций, в зависимости от пола носителя, %	
		носитель-женщина	носитель-мужчина
Синдром Дауна	21q22q	7	2
	21qDq	10	2,4
	21q21q	100	100
Синдром Патау	13q14q	2	1
	13q15q	2	1
	13q13q	100	100

При синдроме Дауна К составляет 1/2, а при трисомиях по 13 и 18 хромосомам (синдромы Патау и Эвардса, соответственно) – 1/4.

Наиболее распространенная причина транслокационных форм хромосомных синдромов – робертсоновская транслокация (гл. 20). Риск возникновения патологии зависит от вовлечения в транслокацию хромосом одной или разных пар. При носительстве любым из родителей робертсоновской транслокации с вовлечением гомологичных хромосом (например, rob13q13q, rob21q21q) беременности будут заканчиваться либо спонтанными абортами, либо, в небольшом проценте случаев, рождением детей с синдромами Патау или Дауна в случае передачи плоду хромосом с транслокацией rob13q13q или rob21q21q соответственно. Генетический риск рождения ребенка с транслокационной формой хромосомного синдрома не зависит от возраста родителей, но зависит от того, какие хромосомы вовлечены в транслокацию (если хромосомы разных пар – риск ниже) и от того, кто является носителем транслокации: женщина или мужчина (если женщина – риск выше; см. табл. 25.6).

глава 26

ЛЕЧЕНИЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Еще до недавнего времени лечение наследственных заболеваний признавалось бесперспективным и практически не проводилось. Установление наследственной природы заболевания предполагало его неуклонное прогрессирование и отсутствие эффекта при использовании как медикаментозных, физических и иных методов терапии, так и хирургических методов лечения. В последние годы, в связи с расшифровкой этиопатогенетических механизмов значительного числа моногенных и мультифакториальных наследственных заболеваний, появилась возможность разработки и совершенствования способов их эффективного лечения. Как и при других болезнях человека, лечение наследственного заболевания может быть: симптоматическим, патогенетическим и этиологическим. Выбор тактики лечения зависит прежде всего от уровня знаний о природе заболевания и патогенетических механизмах его развития.

26.1. СИМПТОМАТИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ

Симптоматическое лечение используется при всех наследственных заболеваниях, независимо от уровня знаний об их патогенезе и этиологии. Оно направлено на коррекцию патологических симптомов и, не воздействуя на причину болезни, приводит к облегчению состояния больного, предотвращению осложнений и снижению темпа прогрессирования заболевания. В качестве симптоматического лечения могут быть использованы лекарственные препараты, хирургическое вмешательство, а также физиотерапевтические и рентгенологические методы. Симптоматическая терапия дает, как правило, кратковременный эффект, и требует проведения повторных курсов лечения, эффективность которых по мере прогрессирования заболевания снижается. В качестве примеров симптоматического лечения можно привести следующие: 1) использование анальгетиков при выраженном болевом синдроме; 2) назначение противосудорожных препаратов при различных формах эпилепсии; 3) использование ангиотензивных средств при различных формах артериальной гипертензии; 4) назначение антигистаминных средств при аллергических заболеваниях; 5) назначение муколитических и бронхолитических средств при муковисцидозе и бронхиальной астме; 6) использование препаратов, улучшающих процессы тканевого дыхания при митохондриальных заболеваниях, прогрессирующих мышечных дистрофиях, спинальных амиотрофиях и др.; 7) использование ноотропных препаратов при различных формах олигофрении и деменции; 8) применение физиотера-

певтических методов лечения (электрофорез с лекарственными препаратами, диадинамические токи, грязевые аппликации и др. при наследственных скелетных дисплазиях, мукополисахаридозах, миопатиях; 9) рентгенотерапевтическое воздействие при различных формах опухолей; 10) хирургическое лечение деформации суставов при некоторых вариантах наследственных моторно-сенсорных нейропатий и мукополисахаридозов, а также коррекция вентрикуломегалии при Х-сцепленных гидроцефалиях. Этот список можно продолжить. Практически для каждой группы наследственных заболеваний разработаны специфические способы симптоматического лечения, облегчающего состояние больного, а в ряде случаев предотвращающего его раннюю гибель. Совершенствование этих способов осуществляется по мере накопления знаний о природе заболеваний и увеличения набора фармакологических препаратов и способов физиотерапевтической и хирургической коррекции выявленных дефектов.

26.2. ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ

Патогенетическое лечение направлено на коррекцию биохимических и физиологических процессов, нарушенных в результате изменения концентрации белкового продукта мутантного гена. Этот метод лечения наиболее эффективен при наследственных болезнях обмена, основным патогенетическим механизмом которых является нарушение утилизации субстрата. Воздействие на процессы обменных превращений может осуществляться несколькими путями и зависит, прежде всего, от того являются ли патологические симптомы заболевания следствием нарушения утилизации субстрата (вводимого извне или синтезированного в организме) или они обусловлены недостатком продуктов его метаболизма в организме больного. Рассмотрим более подробно различные способы проведения лечебных мероприятий при этих двух основных типах патогенетических нарушений на примере наследственных болезней обмена.

Коррекция процессов утилизации субстрата может проводиться несколькими способами. Их выбор зависит от того, являются ли клинические симптомы следствием накопления продукта-предшественника метаболического блока или они – результат дефицита конечного продукта обменных превращений. В первом случае при планировании терапевтической тактики необходимо учитывать следующее: 1) синтезируется ли субстрат в организме или поступает с пищей; 2) обусловлен ли патогенез заболевания нарушением ферментативного расщепления или процесса транспорта субстрата через слизистую желудочно-кишечного тракта и почки.

Если симптомы заболевания обусловлены нарушением утилизации субстрата, не синтезирующегося в организме, а поступающего с пищей, основным способом терапевтической коррекции является диетотерапия. Она направлена на ограничение или полное прекращение поступления в организм продукта, превращение которого нарушено в результате ферментативного дефекта. В качестве примера эффективного применения такого лечения можно привести фенилкетонурию и галактоземию, при

которых назначение диеты, не содержащей фенилаланина и лактозы, соответственно, в первые недели жизни ребенка, предотвращает развитие клинических проявлений. Таким образом, при этих заболеваниях нет необходимости осуществлять заместительную терапию путем введения в организм недостающего фермента.

Другой подход используется при наследственных заболеваниях, обусловленных нарушением утилизации субстратов, которые синтезируются в организме человека. В этом случае основные пути терапевтических воздействий должны быть направлены на устранение блока биохимических реакций и выведение из организма накапливающегося субстрата или продуктов, образующихся в результате функционирования побочных путей его превращения. Как правило, нарушение утилизации субстрата возникает в результате мутации в генах ферментов, катализирующих соответствующие биохимические реакции, однако в ряде случаев блокирование биохимического пути обусловлено снижением концентрации или нарушением транспорта коферментов, прежде всего витаминов. В связи с этим основные методы терапевтического воздействия должны быть направлены на повышение активности фермента. Этого можно достичь несколькими путями: 1) применением лекарственных препаратов, стимулирующих выработку ряда ферментов (особенно продуцируемых структурами эндоплазматического ретикулума); 2) введением коферментов; 3) введением чистого фермента. Эффективность первых двух подходов недостаточно высока, хотя они продолжают использоваться при лечении ряда наследственных заболеваний. Например, при метилмалоновой ацидемии в качестве кофактора используют кобаламин, при гомоцистинурии – пиридоксин, при множественной недостаточности СоА-дегидрогеназ – рибофлавин. Для стимуляции процессов функционирования дыхательных цепей митохондрий назначают препараты: филлохинон, содержащий витамины K_1 и K_3; янтарную кислоту, рибофлавин, никотинамид, а также витамины С и Е, которые являются донорами и акцепторами электронов и обеспечивают антиоксидантный эффект.

Введение коферментов оказывается эффективным лишь для тех редких заболеваний, которые обусловлены мутациями в генах, детерминирующих синтез кофакторов или веществ, ответственных за их транспорт. В качестве примера такого заболевания можно привести наследственную *атаксию, обусловленную дефицитом витамина Е*. Эта редкая форма атаксий распространена в странах Средиземноморья и в Африке и связана с мутациями в гене микросомального белка, являющего транспортером активной молекулярной формы витамина Е – α-токоферола. Снижение концентрации этого белка приводит к нарушению секреции α-токоферола из печени в кровь и его дефициту в организме. Наиболее эффективный метод лечения этого заболевания – пожизненная заместительная терапия витамином Е. С ее помощью удается предотвратить развитие заболевания.

Безусловно, наиболее эффективным способом терапевтической коррекции энзимопатий является введение недостающего фермента в клетки-мишени. Для этого необходимо 1) получить в достаточном количестве стерильные, неиммуногенные ферменты; 2) преодолеть иммунную защиту организма; 3) обеспечить доставку фермента в клетки-мишени. Наиболее перспективной в настоящее время представляется коррекция ферментативных дефектов при, так называемых, лизосомных болезнях, обусловленных снижением активности ферментных систем лизосом. Значимо-

го эффекта удалось добиться с помощью клеточной ферментотерапии при болезни Гоше – аутосомно-рецессивном наследственном заболевании, обусловленном мутацией в гене *лизосомного фермента – глюкоцереброзидазы*. Дефицит этого фермента приводит к нарушению процесса расщепления липида – глюкоцереброзида – в лизосомах клеток моноцитарно-микрофагальной системы. В результате формируются раздутые нагруженные липидами клетки Гоше, которые вытесняют нормальные клетки различных органов (прежде всего в печени, селезенке, костном мозге). В настоящее время для терапевтической коррекции этого заболевания создан препарат церезим, содержащий 200 ЕД модифицированного фермента β-глюкоцереброзидазы, способного осуществлять гидролиз глюкоцереброзидов до глюкозы и церамида. Рано начатая заместительная терапия этим препаратом предотвращает развитие заболевания и инвалидизацию больных. Обнадеживающие результаты получены при изучении терапевтической эффективности заместительной ферментотерапии болезни Фабри, болезни Помпе и некоторых вариантов мукополисахаридозов. Наибольшего успеха удается добиться при лечении, так называемых висцеральных форм лизосомных болезней, не сопровождающихся поражением нервной системы. Это связано с тем, что до настоящего времени не удалось создать ферментативные препараты, успешно проникающие через гематоэнцефалический барьер и оказывающие воздействие на обменные процессы в нейронах.

При ряде редких наследственных заболеваний клинические проявления обусловлены повышением активности фермента, в связи с чем терапевтические мероприятия направлены на подавление его активности. Так, например, при порфирии, обусловленной высокой активностью аминолевуленат-синтетазы, назначают препарат гематин, который, ингибируя действие данного фермента, улучшает состояние больного.

Если коррекция ферментативного дефекта невозможна, терапия должна быть направлена на стимуляцию выведения накапливающегося субстрата и его метаболитов с целью предотвращения их токсического действия. Для этого применяют препараты, которые образуют нетоксические соединения с продуктом, подлежащим выведению. Эти соединения выводятся через почки или желудочно-кишечный тракт. Например, для лечения болезни Вильсона–Коновалова, обусловленной мутациями в гене медь-транспортирующей АТРазы Р-типа (она обеспечивает встраивание меди в молекулы медь-содержащих белков и их экскрецию клетками печени), применяется препарат D-пеницилламин. Этот препарат содержит сульфгидрильные группы, образующие комплексы с тяжелыми металлами, в том числе и с медью.

При заболеваниях, клинические проявления которых обусловлены дефицитом конечного продукта обменных превращений, лечение направлено на возмещение недостающего субстрата. Такой терапевтический подход наиболее эффективен при гормон-дефицитных патологиях. Например, раннее назначение тироксина при врожденном гипотиреозе полностью предотвращает развитие клинических симптомов. Успешно проводится заместительная терапия гормоном роста при гипофизарном нанизме и стероидами при врожденной гиперплазии коры надпочечников.

Основные методы терапии наследственных заболеваний представлены в табл. 26.1.

Таблица 26.1. Методы лечения наследственных заболеваний

Метод лечения	Заболевание
Лекарственная индукция ферментных систем	
Фенобарбитал	Сидромы Жильбера и Криглера–Найяра
Восполнение дефицита фермента/белка	
Переливание крови	Тяжелый комбинированный иммунодефицит (дефицит аденозиндезаминазы), гемофилии, гемоглобинопатии
Ферментно/белковые препараты	
Трипсин	Дефицит трипсиногена
α–1-антитрипсин	Дефицит α-1-антитрипсина
Криопреципитация/фактор VIII	Гемофилия А
β-глюкозидаза (церезим, церидаза)	Болезнь Гоше
α-галактозидаза (фабразайм)	Болезнь Фабри
Восполнение дефицита кофактора (витамины или коэнзимы)	
B_6	Пиридоксин-зависимые судороги
B_{12}	Метилмалоновая ацидурия
Биотин	Недостаточность биотинидазы
D	Витамин-D-резистентный рахит
E	Атаксия с дефицитом витамина E
L-карнитин	Системная недостаточность карнитина
Восполнение дефицита конечного продукта	
Кортизол	Врожденная гиперплазия коры надпочечников
Тироксин	Врожденный гипотиреоз
Соматотропный гормон	Гипофизарный нанизм
Ограничение количества субстрата в пище	
Аминокислоты	
Фенилаланин	Фенилкетонурия
Фенилаланин, тирозин	Тирозинемия
Лейцин, изолейцин, валин	Болезнь кленового сиропа
Углеводы	
Лактоза и галактоза	Галактоземия
Липиды	
Холестерин	Семейная гиперхолестеролемия
Белок	Нарушения цикла мочевины
Коррекция выведения продукта	
D-пеницилламин	Болезнь Вильсона–Коновалова, цистинурия
L-карнитин	Органические ацидурии
Ограничения применения лекарственной терапии	
Сульфаниламиды	Дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, порфирия
Барбитураты	
Замещение поврежденных тканей	
Трансплантация почки	Поликистоз почек взрослых, болезнь Фабри
Трансплантация костного мозга	Тяжелые формы X-сцепленного комбинированного иммунодефицита
Удаление пораженных тканей	
Колоэктомия	Семейный аденоматозный полипоз
Спленэктомия	Сфероцитарная анемия
Удаление фибром	Нейрофиброматоз

26.3. ЭТИОЛОГИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ

Наиболее перспективным и эффективным способом лечения наследственной патологии человека является коррекция генетического дефекта на уровне генов, то есть воздействие на этиологические факторы возникновения заболевания. Именно это направление в лечении наследственной патологии часто обозначают как **генотерапия** («молекулярное протезирование»). Разрабатываются три основные подхода к коррекции генетических дефектов посредством генотерапии: 1) компенсация экспрессии функционально неактивных аллелей введением в клетку дополнительных копий гена; 2) угнетение избыточной экспрессии гена; 3) усиление иммунного ответа организма. **Первый подход** основан на введении в определенные клетки и ткани организма дополнительного генетического материала, корригирующего нарушение экспрессии одного или нескольких мутантных генов. Этот подход наиболее часто используют для коррекции генетического дефекта при моногенных и некоторых мультифакториальных заболеваниях. Коррекция генетического дефекта осуществляется как в половых, так и в соматических клетках организма. Более предпочтительна генотерапия на уровне соматических клеток, так как она позволяет модифицировать экспрессию генов в определенном типе клеток и тканей и не приводит к передаче измененной генетической информации в ряду поколений. **Второй подход** основан на подавлении избыточной функции генов и их продуктов в клетках. Этот подход чрезвычайно перспективен для лечения онкологических заболеваний. В этом случае используют несколько генотерапевтических методов: 1) введение генов, продукты которых приводят к гибели избыточно пролиферирующих клеток (генов-убийц); 2) блокирование экспрессии онкогенов путем введения антисмысловых нуклеотидных последовательностей или генов, продукты экспрессии которых являются антителами для ряда белковых продуктов опухолевой клетки; 3) введение в опухолевые клетки нормальных копий генов-супрессоров. **Третий подход** направлен на повышение иммунореактивности клеток-мишеней или активации иммунной системы организма и разрабатывается для онкологических и вирусных заболеваний.

Рассмотрим более подробно использование этих трех способов генотерапии.

Коррекцию функции мутантных генов и восстановление их экспрессии можно осуществить двумя путями: 1) заменой мутантного гена его нормальной копией; 2) введением нормальной копии гена при сохранности мутантной. Наиболее часто применяют второй подход генотерапевтической коррекции наследственных дефектов, что обусловлено техническими трудностями, возникающими как при удалении мутантного аллеля, так и при последующем встраивании его нормальной копии.

Первые успешные опыты по генотерапии наследственных заболеваний проведены в 1990 г. в США. Они были направлены на коррекцию генетического дефекта при тяжелом комбинированном иммунодефиците, обусловленном мутацией в гене аденозиндезаминазы. Снижение активности этого фермента приводит к выраженному подавлению иммунного ответа в результате накопления в организме дезоксиаденозина, оказывающего токсическое действие на Т- и В-лимфоциты. Введение двум больным с этим тяжелым заболеванием нормальной копии гена с Т-лимфоцитами или стволовыми клетками костного мозга привело к практически полной компенса-

ции иммунодефицита. На сегодняшний день проведено уже более 600 клинических испытаний по генотерапии ряда моногенных и онкологических заболеваний человека. Однако до настоящего времени генотерапевтическая коррекция наследственных дефектов не нашла широкого применения в клинической практике. Это связано прежде всего с проблемой доставки генетического материала и невозможностью существующими методами добиться стабильной экспрессии трансдуцированного гена в клетках и тканях больного. Разрабатываются два основных способа доставки генов в соматические клетки человека — in vitro и *in vivo*. Первый способ предполагает перенос генов в культуру клеток человека, после чего трансдуцированные клетки вводятся в организм хозяина. При втором способе доставка нормального гена осуществляется непосредственно в организм человека. Используются два основных способа доставки генетического материала в клетки человека: прямой перенос некомпактизированной («голой») плазмидной ДНК, свободной от белков, с которыми она обычно связана в хромосомах, и доставка генных конструкций с помощью векторных систем.

Для прямого переноса генетического материала в клетку используют флуоресцентно-меченную плазмидную ДНК, методику гидродинамического шока, насыщение ДНК полианионом (гепарином, декстран-сульфатом), а также ряд физических способов доставки ДНК. Среди физических методов доставки генетических конструкций в организм человека: электропорация, баллистическая трансфекция («генное ружье») и безигольное введение (бомбардировка клеток молекулами ДНК, связанными с различными металлами — Au^{+}, Ca^{++}).

В качестве векторных систем могут быть использованы некоторые вирусы, липосомы (липидные пузырьки с включенными в них фрагментами ДНК) и катионные полимеры (полиэтиленамин, полилизин, лизин-гистидиновый полимер).

Наиболее перспективными при проведении генотерапии считаются вирусные векторные системы, содержащие человеческий ген, встроенный в определенный участок генома вируса. Более чем в 80% всех генотерапевтических испытаний для доставки генетического материала были использованы именно вирусные векторы. Известно, что вирусы легко проникают в клетку, взаимодействуя с белками мембраны и клеточными рецепторами, и могут интегрироваться в ядерный геном. Наличие специфического набора поверхностных белков позволяет различным вирусам внедряться в определенный тип клеток, осуществляя тканеспецифическую экспрессию гена. Наиболее часто в качестве векторных систем используются аденовирусы, ретровирусы и лентивирусы, которые различаются по ряду характеристик:

1) способности трансфекции пролиферирующих и непролиферирующих клеток;

2) способности интеграции в геном хозяина и, следовательно, длительности и направленности экспрессии;

3) уровню иммуногенности (степени иммунного ответа на введение векторной системы);

4) степени риска возникновения инсерционных мутаций;

5) пакующей способности вектора, определяющей размер генетического материала, который может быть введен в вектор.

Необходимо отметить, что не существует универсального носителя, который обеспечил бы эффективную доставку генетического материала при всех наследственных заболеваниях. В последние годы рассматривается возможность создания

невирусных носителей, представляющих собой мультифункциональные самособирающиеся комплексы с ДНК, в которых каждый компонент имеет определенную функцию по преодолению различных барьеров в организме человека.

Среди новых перспективных подходов к коррекционной генотерапии следует отметить метод **химеропластики**, основанный на генной конверсии в клетках, полученных от больного. Показано, что при добавлении в культуру делящихся клеток различных фрагментов геномной ДНК (химеропластов) можно добиться их гомологичной рекомбинации с нативной ДНК. В состав химеропластов входят короткие цепочки ДНК (около 25 нуклеотидов) и комплементарные им цепочки РНК. При этом в последовательность ДНК/РНК шпилечной структуры включается основание, по которому планируется замена. Замещение нужного кодона в структуре ДНК (конверсия) в клетках мишенях происходит достаточно эффективно и обнаруживается в 25%-40% клеток in vitro. После осуществления химеропластики клетки мишени возвращаются в организм больного. Возможно, также проводить замену не всего гена, а только некоторых его экзонов, несущих мутацию. Этот метод получил название метода перепрыгивания экзонов (exon-skipping). Его суть состоит в возникновении гибридизации in vitro в культуре клеток больного его ДНК с короткими антисмысловыми последовательностями РНК, комплементарных местам сплайсинга первичного РНК-транскрипта. Это, в свою очередь, приводит к проскальзыванию петли сплайсинга и удалению из мРНК мутантных экзонов.

В последние годы разрабатывается еще один, принципиально новый подход к коррекции генетического дефекта при моногенных заболеваниях. Он основан на специфической **активации нормальных генов**, являющихся гомологами мутантных генов, путем введения химических стимуляторов. Этот подход наиболее интенсивно разрабатывается при двух заболеваниях – прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшенна/Бекера и серповидноклеточной анемии. При прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшенна/Бекера активируют ген белка утрофина, локализованный на хромосоме 6q24. Показано, что этот ген, подобно гену дистрофина, экспрессируется в мышцах, мозге и висцеральных тканях и его продукт - утрофин– способен взаимодействовать с белками дистрофин-ассоциированного комплекса в раннем эмбриогенезе. Возможно, утрофин представляет собой фетальную изоформу дистрофина и его ген можно рассматривать как аутосомный гомолог гена дистрофина. В опытах на утрофин/дистрофин дефицитных линиях трансгенных мышей показано, что введение им укороченной формы утрофина приводит к восстановлению функций дистрофин-ассоциированного комплекса белков и коррекции основных миопатических симптомов.

Сравнительная характеристика различных способов доставки генетического материала в клетки человека представлена в табл. 26.2.

При онкологических заболеваниях наиболее часто используются генотерапевтические подходы, направленные на прекращение или резкое снижение репликации ДНК опухолевой клетки, подавление экспрессии онкогенов или введение генов-супрессоров (например, *TP53*). Снижения синтеза ДНК в опухолевой клетке можно добиться путем введения генов, экспрессирующих ферменты, которые тормозят репликацию ДНК. Один из таких ферментов – тимидинкиназа вируса простого герпеса. Тимидинкиназа фосфорилирует ганцикловир, превращая его в ганцикловир-трифосфат, который способен встроиться в нуклеотидную последовательность ДНК, терминируя ее синтез и приводя к гибели делящейся опухолевой клетки.

Таблица 26.2. **Преимущества и недостатки методов доставки генетического материала, используемых при генотерапии**

Средство доставки	*Преимущества*	*Недостатки*
Плазмидная «голая» ДНК	Дешевизна; простота хранения и контроля качества; низкая иммуногенность	Низкая эффективность трансфекции; малая продолжительность экспрессии; трудности направленного переноса
Аденовирусы	Высокая эффективность трансфекции; возможен направленный перенос	Сильный иммунный ответ; малый размер вставки – 7,5 т.п.н.; затруднен контроль качества
Ретровирусы	Высокая эффективность трансфекции; длительная экспрессия; низкая иммуногенность	Низкая эффективность трансфекции; малый размер вставки – 8 т.п.н.; риск инсерционного мутагенеза
Аденоассоциированные вирусы	Эффективная трансфекция; длительная экспрессия; низкая иммуногенность	Риск инсерционного мутагенеза; трудности производства, хранения и контроля качества; малый размер вставки – 4,5 т.п.н.
Физические методы	Низкая иммуногенность; простота контроля качества	Малая длительность экспрессии; локальный эффект трансфекции
Катионные липиды	Низкая иммуногенность; простота контроля качества	Низкая эффективность трансфекции; трудности направленного переноса; малая длительность экспрессии
Катионные полимеры, пептиды	Низкая иммуногенность; возможен направленный перенос	Низкая эффективность трансфекции; малая длительность экспрессии, отсутствие опыта клинических испытаний

Блокирование экспрессии онкогенов может осуществляться двумя путями: введением антисмысловых нуклеотидных последовательностей, связывающих мРНК онкогенов, или генов, кодирующих антитела к мутантному белку.

Большое количество попыток генотерапии опухолевых заболеваний основаны на стимуляции иммунной системы целого организма и повышении иммунореактивности самих опухолевых клеток. Активация иммунного ответа организма может быть достигнута при помощи введения генов, продукты которых являются стимуляторами иммунитета, например цитокинами. Повышения иммунореактивности опухолевых клеток можно добиться и введением в биоптат опухолевых клеток больного генов-белков иммуностимуляторов (интерлейкинов, интерферона, фактора некроза опухолей и др.) in vitro. Трансформированные таким образом высоко им-

муногенные и инактивированные путем облучения опухолевые клетки вводят, как вакцину, в организм больного.

Таким образом, из разработанных современных методов лечения наследственных заболеваний человека генотерапия представляется наиболее перспективным при условии решения всех вышеперечисленных проблем.

Наряду с генноинженерными подходами к коррекции генетического дефекта разрабатывается еще одно направление в лечении наследственных болезней, получившее название **клеточная терапия.** Суть метода заключается во введении в пораженную ткань клеток-предшественников, полученных от здорового донора. Наиболее интенсивно это направление разрабатывается при лечении наследственных миопатий, прежде всего, прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшенна/Бекера. Известно, что мышцы человека в постнатальном периоде состоят из многоядерных клеток – миофибрилл, которые в процессе онтогенеза формируются из одноядерных миобластов путем их слияния. Миобласты в небольших количествах присутствуют в скелетной мускулатуре взрослого человека. Выделенные из биоптатов здоровых доноров и культивированные миобласты сохраняют способность к слиянию с многоядерными миофибриллами. Показано, что при трансплантации культивированных миобластов в мышечную ткань больного ПМДД/Б происходит внедрение ядра донорского миобласта в миофибриллу больного, в результате чего индуцируется экспрессия нормального гена дистрофина. К недостаткам этого метода следует отнести кратковременную экспрессию генов ядер донорской клетки и трудности получения неиммуногенной чистой культуры миобластов.

26.3.1. БИОЭТИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ГЕНОТЕРАПИИ

Несмотря на то, что все процедуры генотерапии строго регламентированы и подчиняются принятым на сегодняшний день правилам безопасности, введение генных конструкций в организм человека требует особого внимания. Важнейшее значение имеет тип клеток, служащих объектом генотерапии. Любое введение в клетки человека генетического материала может иметь отрицательные последствия, связанные с неконтролируемым встраиванием и нарушением функции генов. Однако отрицательные последствия генотерапии соматических и половых клеток несоизмеримы по своему масштабу. В первом случае речь идет о судьбе одного тяжело больного индивида, и риск, вызываемый лечебными процедурами обычно ниже, чем риск смертельного исхода от первичного заболевания. Кроме того, степень генетического риска при генотерапии соматических клеток снижается при использовании генетических конструкций, неспособных к встраиванию в геном клетки-реципиента. При введении генетических конструкций в половые клетки возникает опасность внесения нежелательных изменений в геном будущих поколений. В международных документах Всемирной организации здравоохранения, ЮНЕСКО, Совета Европы признается этически допустимой только генотерапия соматических клеток.

Можно надеяться, что внедрение генотерапии в практическое здравоохранение поможет преодолеть, хотя бы частично, и некоторые нравственные проблемы. Тем более, что ведущей тенденцией развития новых генетических технологий является все большая миниатюризация процедур генодиагностики и генотерапии и сдвиг времени их выполнения на все более ранние сроки беременности.

ЛИТЕРАТУРА

Агеенко А.И. Онкогены и канцерогенез. М.: Медицина, 1986. 256 с.

Бадалян Л.О. Лекции по клинической генетике. Уч. изд. 2 МОЛГМИ им. Н.И. Пирогова, 1974. 208 с.

Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. . Геном человека и гены «предрасположенности». Введение в предиктивную медицину. С-Пб.: Интермедика, 2000, 271 с.

Бочков Н.П. Клиническая генетика: 2-ое издание М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. 448 с.

Бочков Н.П., Захаров А.Ф., Иванов В.И. Медицинская генетика (Руководство для врачей)/АМН СССР. М.: Медицина, 1984, 368 с.

Варсанова С.Г., Юров Ю.Б., Чернышов В.Н. Хромосомные синдромы и аномалии. Классификация и номенклатура. Ростов-на-Дону. 1999. 191 с.

Геннис Р. Биомембраны. Молекулярная структура и функции. Пер. с англ. М.: Мир, 1997, 622 с.

Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. М.: Мир, 2002. 589 с.

Горбунова В.Н. Молекулярные основы медицинской генетики. С-Пб.: Интермедика, 1999. 212 с.

Горбунова В.Н., Баранов В.С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. С-Пб.: Специальная литература, 1997. 287 с.

Горбунова В.Н., Савельева-Васильева Е.А., Красильников В.В. Молекулярная неврология. Часть I. Заболевания нервно-мышечной системы. С-Пб.: Интермедика, 2000. 320 с.

Диагностика наследственных болезней: Сборник научных трудов/Под ред. С.И. Козловой. М.: ВАСХНИЛ, 1986.

Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 271 с.

Зуев В.А., Завалишин И.А., Ройхель В.М. Прионные болезни человека и животных. Руководство для врачей. М.: Медицина, 1999. 192 с.

Иванов В.И., Ижевская В.Л. В кн.: Биомедицинская этика. Покровский В.И., Локухин Ю.М. (ред.). М.: Медицина. 1999. С. 113–127.

Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии. М.: Медицинское информационное агентство, 2002. 591 с..

Кисляк Н.С., Ленская Р.В. Клетки крови у детей в норме и патологии. М.: Медицина, 1978, 256 с.

Козлова С.И., Семанова Е., Демикова Н.С., Блинникова О.Е. Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование: Справочник. Л.: Медицина, 1987. 320 с.

Лильин Е.Т., Богомазов Е.А., Гофман Кадашников П.Б. Генетика для врачей. М.: Медицина, 1990, 255 с.

Методические рекомендации по работе с диагностическими наборами. М.: ООО «Центр Молекулярной генетики»/Лаборатория ДНК-диагностики МГНЦ РАМН, 2001. 49 с.

Многоликость современной генетики человека: Коллективная монография. Уфа.: Гилем, 2000. 298 с.

Мышечные ткани. Под ред. Ю.С. Ченцова. М.: Медицина, 2001. 235 с.

Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Под ред. А.Б. Масленникова. Вып. 3. Новосибирск.: Альфа Виста, 2003, 188 с.

Наследственные болезни нервной системы: Руководство для врачей. Под ред. Ю.Е. Вельтищева, П.А. Тёмина. М.: Медицина, 1998, 496 с.

Наследственная патология человека. Под ред. Ю.Е. Вельтищева, Н.П. Бочкова. В 2-х томах. М.: Медицина, 1992.

Православие и проблемы биоэтики//Православный медико-просветительный центр «ЖИЗНЬ». М.: 2001.

Пузырев В.П., Степанов В.А. Патологическая анатомия генома человека. Новосибирск.: Наука, 1997. 224 с.

Современные методы диагностики наследственных болезней. Материалы научно-практической конференции. Москва. 20–21 ноября 2001 г.

Стивенсон А., Дэвисон Б. Медико-генетическое консультирование. Пер. с англ. М.: Мир, 1972. 504 с.

Тератология человека. Под ред. Г.И. Лазюка. М.: Медицина, 1979. 440 с.

Фогель Ф. Мотульски А. Генетика человека: в 3-х томах. Пер. с англ. М.: Мир. 1989.

Цитогенетические карты аутосомных сегментных анеусомий человека. Под ред. В.И. Иванова. Лаборатория генетики развития МГНЦ РАМН. Москва. 2000.

Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родуэлл. Биохимия человека: в 2-х томах. Пер. с англ. М.: Мир, 1993.

Сингер М., Берг П. Гены и геномы: в 2-х томах. Пер. с англ. М.: Мир, 1998.

Bioethics in Asia. Fujiki N., Macer D.R.J. (eds.). Tsukuba: EUBIOS Ethics Institute. 1998.

Gelehrter T.D., Gollins F.S., Ginsburg D. Principles of medical genetics. Ed. 2. Williams & Wilkins. 1998.

Genomics and World Health. Geneva.: WHO, 2002.

Inherited Disorders of Skeleton. P. Beighton. Churchill Livingstone. Edinburgh London and New York, 1978.

V.A. McKusick. Mendelian inheritance in man. Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive, and X-linked phenotypes. The Johns Hopkins university press. Baltimore and London.

Mitelman F. (ed.) An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: ISCN, 1995.

Mueller R.F., Young I.D. Emery's elements of medical genetics. Ed. 8. Churchill Livingstone, Harcourt Publishers limited, 2001. p. 372.

Scriver Ch.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D. The Motabolic & Molecular Bases of Inherited Disease. The McGraw-Hill Companies Medical Publishing division, 2001.

Universal Declaration on the Human Genome and Human Rights. Paris: UNISCO. 1997.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

СОДЕРЖАНИЕ

Часть II. МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА